

Deltaplan Erwinia C

Praktijkgericht (C-) onderzoek aan Erwinia-problemen in
bloembolgewassen 2009-2013.

Auteur(s) Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen, Wendy Martin en
Robert Dees

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
Onderdeel van Wageningen Universiteit
Busines Unit Bloembollen, oomkwekerij en Fruit
PPO nr. 3234071100/ PT nr: 13374
December 2013

© 2013. Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

De bloemen- en plantensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

PPO projectnummer: 32 340711 00

PT nummer: 13374

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Bomen en Fruit

Adres : Prof. van Slogterenweg 2
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252-462121
Fax : 0252-462100
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	7
1 INLEIDING	9
2 ENQUÊTE HYACINTEN TELERS: PROBLEMEN MET <i>ERWINIA</i>	13
2.1 Inleiding	13
2.2 Opzet	13
2.3 Resultaten	13
2.4 Conclusies	24
2.5 Samenvatting en discussie	27
3 IDENTIFICATIE EN DETECTIE VAN <i>DICKEYA</i> EN <i>PECTOBACTERIUM</i> SOORTEN.....	29
3.1 <i>Dickeya</i> soorten in bolgewassen	29
3.1.1 Conclusie	29
3.2 Variable number of tandem repeats (VNTR) merkers voor karakterisatie van <i>Dickeya</i> en <i>Pectobacterium</i> (<i>Pcc</i>) tot op isolaatniveau	30
3.2.1 Ontwikkeling van VNTR merkers voor karakterisatie van <i>Dickeya</i> soorten tot op isolaat niveau 30	
3.2.2 Resultaten en bruikbaarheid van VNTR voor onderscheid van isolaten van de diverse <i>Dickeya</i> soorten 32	
3.2.3 Conclusie	33
3.3 Ontwikkeling van VNTR merkers voor karakterisatie van <i>Pectobacterium</i> soorten tot op isolaatniveau.....	34
3.3.1 Ontwerpen van VNTR's voor analyse van <i>Pectobacterium carotovorum</i> isolaten	34
3.3.2 Resultaten en bruikbaarheid van VNTR analyses voor <i>Pectobacterium carotovorum</i> isolaten 34	
3.3.3 Conclusie	36
4 GEVOELIGHEID VAN BOLGEWASSEN VOOR <i>DICKEYA</i> SOORTEN EN <i>PECTOBACTERIUM</i> ISOLATEN	37
4.1 Inleiding	37
4.2 Infectie van bollen: vacuuminfiltratiemethode.....	37
4.2.1 Materiaal en methode.....	37
4.2.2 Resultaten	38
4.2.3 Conclusie	39
4.3 Waardplantbereik van <i>Pectobacterium</i> en <i>Dickeya</i> bepaald via aanprikken <i>in vitro</i> en in bollen....	39
4.3.1 Materiaal en methode.....	39
4.3.2 Resultaten	41
4.3.3 Conclusie en discussie	43
5 RESISTENTIE (TOLERANTIE) BIJ DAHLIA- EN ZANTEDESCHIA CULTIVARS	45
5.1 Inleiding	45
5.2 Tolerantie bij Dahlia.....	46
5.2.1 Materiaal en methode infectie knollen 2009	46
5.2.2 Resultaten infectie knollen	46
5.2.3 Infectie stekken 2010	47
5.2.4 Infectie stekken 2011	49
5.2.5 Conclusie	50
5.3 Resistentie (tolerantie) bij Zantedeschia	50

5.3.1	Inleiding	50
5.3.2	Uitvoering en resultaten.....	51
5.3.3	Resultaten Zantedeschia 2012.....	53
5.3.4	Conclusie en discussie	55
6	VOLGEN VAN PARTIJEN BOLLEN OP AANWEZIGHEID VAN <i>ERWINIA</i>	57
6.1	Infectieroutes	57
6.2	Infectieroute van <i>Erwinia</i> : via de wortel?	57
6.2.1	Materiaal en methode.....	58
6.2.2	Resultaten.....	58
6.2.3	Conclusie en discussie	59
6.3	Veldsymptomen van <i>Dickeya</i> spp.	60
6.3.1	Inleiding	60
6.3.2	Materiaal en Methode.....	60
6.3.3	Resultaten.....	62
6.3.4	Conclusie en discussie	63
6.4	Volgen van partijen hyacinten op <i>Erwinia</i> -besmetting.....	63
6.4.1	Inleiding	63
6.4.2	Uitvoering en resultaten.....	63
6.4.3	Conclusie en discussie	64
6.5	Volgen van partijen <i>Dahlia</i> op aanwezigheid van <i>Erwinia</i>	65
6.5.1	Inleiding	65
6.5.2	Uitvoering en resultaten.....	65
6.5.3	Conclusie.....	67
6.6	Volgen van partijen <i>Zantedeschia</i> op aanwezigheid van <i>Erwinia</i>	67
6.6.1	Inleiding	67
6.6.2	Materiaal en methode.....	67
6.6.3	Resultaten 2009.....	68
6.6.4	Discussie Zantedeschia 2009	68
6.6.5	Monsters 2010.....	68
6.6.6	Conclusie volgen van partijen Zantedeschia.....	68
7	MIDDELEN EN SNEL DROGEN	71
7.1	Inleiding	71
7.2	Middelen getest d.m.v. MIC en in vitro	71
7.2.1	Materiaal en methoden.....	71
7.2.2	Resultaten.....	72
7.2.3	Conclusie en discussie	74
7.3	Effect van carvacrol en Nopath op een <i>Erwinia</i> infectie getest <i>in bolla</i>	74
7.3.1	Materiaal en methode.....	74
7.3.2	Resultaten effecten middelen.....	75
7.3.3	Conclusie en discussie	75
7.4	Effect van drogen op infectie met <i>Dickeya solani</i>	76
7.4.1	Materiaal en methode.....	76
7.4.2	Resultaten.....	76
7.4.3	Conclusie en discussie	78
7.5	Effect van Aquanox op hyacintenbollen met snot	78
7.5.1	Inleiding	78
7.5.2	Materiaal en methode.....	79
7.5.3	Resultaten.....	79
7.5.4	Conclusie en discussie	80
7.6	Verspreiding van <i>Erwinia</i> via de lucht.....	81
7.6.1	Inleiding	81
7.6.2	Materiaal en methode.....	81

7.6.3	Resultaten.....	82
7.6.4	Conclusie en discussie	82
8	<i>ERWINIA</i> OVERLEG MET DE AARDAPPELENSECTOR.....	83
9	DISCUSSIE	85
9.1	Enquête	85
9.2	Toetsmethoden en isolaten van <i>Erwinia's</i>	85
9.3	Resistentie en tolerantie	86
9.4	Volgen van partijen op <i>Erwinia</i> -aantasting.....	87
9.5	Middelen en droging om <i>Erwinia's</i> te beheersen	88
9.6	Toekomstig onderzoek.....	89
10	OUTPUT	91
10.1	Begeleidingscommissie vergaderingen	91
10.2	Lezingen en Open dagen.....	91
10.3	Vakbladartikelen.....	92
11	LITERATUUR	95

Samenvatting

Erwinia chrysanthemi en *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, tegenwoordig *Dickeya* spp. respectievelijk *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) veroorzaken een kwaliteitsziekte in niet alleen bloembollen maar ook in aardappelen en andere gewassen. In 2008 eindigde het eerste *Erwinia*-onderzoek welke het probleem inventariseerde en aanbevelingen ter beheersing en toetsmogelijkheden opleverde. Als vervolg richtte het Deltaplan C project zich vooral op *Dickeya* welke agressief snot veroorzaakt in bolgewassen als hyacint, iris en Dahlia maar ook op *Pectobacterium* als veroorzaker van rot in Zantedeschia. Dit vond plaats in samenwerking met PRI en de aardappelsector (HZPC) met focus op verbeterde toetsing en preventie.

Er is een **enquête** gehouden onder hyacintentelers om te inventariseren in hoeverre men nu last heeft van nieuwe agressief snot en het oude witsnot: de incidentie, mogelijke oorzaken en welke maatregelen nu werken.

Problemen zijn er vooral in de schuur; 60% heeft wel eens problemen met snot welke jaarlijkse fluctueren. Tien bedrijven hadden *Erwinia*-problemen in meer dan 10% van hun partijen; de meeste symptomen traden op na verwerken en afleveren. De meeste telers hebben geen idee hoe "het agressief snot er in komt".

Als best practises om snot te beheersen werden genoemd het goed drogen van partijen, gezond uitgangsmateriaal en voorzichtig behandelen bij de juiste omstandigheden van de bollen. Ook het rooitijdstip en het consequent weggooien van verdachte partijen zijn voorwaarden voor een gezonde teelt van hyacint.

Voor specifieke en betrouwbare *Erwinia* monitoring zijn DNA-toetsen (TaqMan PCRs), ontwikkeld door PRI gebruikt om de diverse *Dickeya* soorten, die in bloembollen voorkomen te bepalen. Er is een collectie isolaten verzameld uit hyacint, Dahlia, iris, Muscari, Brodiaea, Sedum, Zantedeschia en narcis. De ontwikkelde TaqMans blijken goed bruikbaar om isolaten uit bolgewassen snel te kunnen identificeren en detecteren.

VNTR analyse biedt mogelijk perspectief om isolaten van *Dickeya dianthicola*, *dadantii* en *Pectobacterium* van elkaar te onderscheiden. Het combineren van verschillende VNTR's is hiervoor noodzakelijk evenals onderzoek naar verdere ontwikkeling hiervan.

Met een aanprik- en een bladponsjestoets bleek dat gewassen soms ook door andere *Erwinia*'s konden worden aangetast.

Verbetering van de toetsingsmethoden maakte duidelijk dat er verschillende Erwinia's zijn. In Dahlia lijkt alleen D. dianthicola voor te komen, evenals in Sedum. In narcis, Brodiaea, freesia en iris is tot nu toe alleen D. dadantii aangetoond. In hyacint en muscari wordt vooral D. solani aan getroffen. In hyacint kan ook D. dadantii voorkomen. Het is opvallend dat tot dusver in Zantedeschia geen Dickeya gevonden wordt maar alleen Pcc, en soms ook een Pseudomonas. Deze kennis is van belang in verband in verband met onderlinge besmettingskans. Verdere verbetering van de toetsen is nog nodig.

Er is onderzoek uitgevoerd naar **mogelijke resistentie** (tolerantie) bij Dahlia en Zantedeschia.

Op het veld bleken Dahlia-cultivars gevoelig te zijn voor *D. dianthicola* maar niet voor *D. solani*. Het percentage uitval na besmetting met *D. dianthicola* varieerde tussen de verschillende cultivars van minimaal 9 % tot maximaal 56%. Er lijken dus verschillen in gevoeligheid voor *D. dianthicola* te bestaan, hoewel dit in herhalingsexperimenten met stekken niet duidelijk reproduceerbaar was, mogelijk door de te kleine proef (te weinig plantmateriaal voor significante verschillen). Opvallend was, dat in gezond ogende Dahlia-planten via PCR (TaqMan) latente besmetting met *D. dianthicola* is gevonden. Dit geeft aan dat *Erwinia*'s symptomeloos aanwezig kunnen zijn, een fenomeen wat ook bij hyacint bekend is.

Bij Zantedeschia zijn cultivars onderzocht via biotoetsen op verschillen in resistentie (tolerantie) tegen *Pcc* (*Pectobacterium*). Zowel in een aangepaste bladponsjesproef als in een toets met knolschijfjes zijn vaak verschillen in gevoeligheid voor *Pcc* aangetoond. Echter, deze verschillen waren niet goed reproduceerbaar. Verbetering van de toetsen is nodig al zouden ze nu als ondersteuning bij andere (praktijk) waarnemingen wel waarde kunnen hebben.

Er lijken verschillen in gevoeligheid tussen cultivars van Dahlia en Zantedeschia te bestaan, maar het aantonen daarvan is vereist meer onderzoek.

Alternatieve middelen en preventieve maatregelen tegen bacteriën zijn nauwelijks middelen beschikbaar. De middelen koperoxychloride, carvacrol en gramicidine zijn in hyacint getest met als

referentiemiddelen (het goed afdodende) formaline en Jet 5. In een zgn. 'minimale inhibitie concentratie' bepaling gaven koperoxychloride en carvacrol alleen bij hoge concentraties een remmende werking tegen *Dickeya*- en *Pectobacterium*-isolaten. Etherische oliën carvacrol en Nopath zijn getest in hyacint maar gaven onder de gebruikte omstandigheden (containerproeven) geen duidelijke verschillen in aantallen snotbollen tussen behandelde en onbehandelde hyacinten.

Aquanox is elektrochemisch geactiveerd water. In een onderzoek met *Dickeya solani* geïnfecteerde hyacinten gaf Aquanox nauwelijks tot geen werking onder de gebruikte experimentele omstandigheden. Een kanttekening is, dat de hyacintenbollen door condensvorming een waterfilm ontwikkelden die *Erwinia* infectiegevaar opleverde dan wel de juiste werking van Aquanox verminderde.

Om de mogelijke verspreiding van *Erwinia*'s via de lucht te onderzoeken is op een bedrijf tijdens het drogen van besmette partijen voor de droogwand de door de kisten gaande lucht over twee typen voedingsbodems geleid. In geen van de metingen werd op de bacterie groeiplaten *Erwinia* aangetoond.

Er is tevens geen overdracht van bacterien vastgesteld bij twee kunstmatige luchtstroomexperimenten met besmette hyacintenbollen of openstaande groeiplaten met *Erwinia*'s wat doet concluderen dat via het drogen voor een droogwand via luchtverspreiding onder de gebruikte experimentele condities de kans op *Erwinia*-besmetting (zeer) klein of afwezig is.

Gebleken is dat bij hyacint een besmetting die bij mechanische schade (bijv. rooien en sorteren) optreedt door bijvoorbeeld ontsmetting en/of drogen niet goed meer is te bestrijden. Verspreiding via de lucht bij drogen is niet aangetoond.

Het verloop van aantastingen in partijen hyacint, Zantedeschia en Dahlia is onderzocht.

Uit onderzoek via analyse van partijen hyacinten met verschillende historie (altijd gezond, geringe aantasting of duidelijk aangetast door agressief snot) en gesprekken op diverse hyacintenbedrijven, waar een besmetting met *Erwinia* (onverwacht) optrad, werd duidelijk dat het heel moeilijk is om de mogelijke oorzaak te achterhalen. De informatie over omstandigheden ontbreekt. Eventuele latente besmetting met *Dickeya* kan aanwezig zijn geweest maar is niet vastgesteld.

Voor Dahlia is gedurende drie jaar plantmateriaal gevolgd en gemonitord via PCR analyse.

In de eerste stekken die van deze Dahlia-knollen zijn geplukt is geen *Dickeya dianthicola* aangetoond. Dit is in tegenstelling tot de stekken die eind april zijn genomen van het veld. Monsters van bladsap afkomstig van een lintzaag en heggenschaar waarmee Dahlia's zijn gemaaid, lieten de aanwezigheid van *Dickeya* zien. Op basis van deze resultaten kan worden gesuggereerd dat het maaien (een standaard teelthandeling) een zeer waarschijnlijke besmettingsroute voor *Dickeya* is. Dehalve verdient het aanbeveling uitgangsmateriaal te toetsen specifiek op *D. dianthicola*.

Gedurende drie jaar zijn twee partijen Zantedeschia gevolgd vanuit weefselkweekplantjes van 2009 die op twee kwekerijen zijn afgeleverd. Twee- of driemaal per jaar zijn een groot aantal planten uit deze partijen getoetst met een DNA-test op *Pcc*. Bij aanvang in 2009 is geen *Pcc* aangetoond in het uitgangsmateriaal. Bij de toetsing van de twee partijen vlak voor het planten in 2010 kon in een van de partijen *Pcc* worden aangetoond. Echter, een monster vlak voor de knoelgast van 2010 liet weer wel een vrij grote besmetting met *Pcc* zijn, terwijl toetsing van de knollen na de bewaring (maart 2011) bijna geen besmetting liet zien.

Mogelijk is hier sprake van een latente en zelfs met PCR niet aantoonbare besmetting. Meer onderzoek is nodig om voor Zantedeschia meer informatie over verloop van *Pcc* in partijen plantmateriaal te verschaffen.

Een besmetting kan symptoomloos in gewas, bollen of knollen aanwezig zijn en er kan verspreiding optreden bijvoorbeeld via machinale verwerking en het maaien van Dahliagewas. Schoon uitgangsmateriaal toetsen lijkt een voorwaarde voor een gezonde teelt.

Gedurende 2009 tot 2013 is **samenwerking met de aardappelenbranche** binnen Deltaplan C vorm gegeven door ondermeer regelmatig overleg met de stuur-en begeleidingsgroep van het *Erwinia* Deltaplan pootaardappelen en individueel overleg met HZPC die het Deltaplan C pootaardappelen uitvoerde.

Gezien het grote *Erwinia* probleem voor zowel aardappel-als bloembollenbranche is op de afsluiting van het deltaplan C op 12 december 2012 te Emmeloord voorgesteld **een vervolgonderzoek Deltaplan *Erwinia* 2.0** na te streven. In nauwe samenwerking met PRI, aardappelbedrijfsleven en keuringsdiensten zal de focus liggen op onder andere verbetering van de weerbaarheid van de (bol-) gewassen tegen *Erwinia*, nieuwe toetsmethoden en preventie van verspreiding van *Erwinia*. Omdat ook dit onderzoeksproject uitwees dat gezond uitgangsmateriaal een belangrijke stap is op weg naar een gezondere teelt zal bijna al het uitgangsmateriaal van hyacint voor de vermeerdering getoetst gaan worden op de aanwezigheid van latente *Dickeya*-besmetting als een eerste stap op weg naar het vermeerderen van minder besmette partijen.

1 Inleiding

Erwinia vormt een groot probleem in bloembolgewassen als hyacint, iris, Dahlia en Zantedeschia. Geschat wordt (precieze cijfers ontbreken) dat de economische schade door o.a. uitval van aangetaste bollen en kosten als gevolg van extra uitzoeken ongeveer 5- 8 miljoen euro op jaarbasis bedraagt. De schade door verminderde afname en imagoschade is niet te becijferen. Voor de aardappelsector is dit geschat op ongeveer 22 M€/jaar waarvan 12 M€ in de teelt (Prins et al 2008).

Daar het gaat om een groot economisch probleem hebben aardappelsector en bloembollensector zich verenigd in een zgn. Deltaplan. Dit houdt in, dat men onderzoek op drie niveaus (A, B en C; zie Fig.0) wil laten uitvoeren:

- A. Fundamenteel onderzoek: onderzoek dat op langere termijn mogelijk soelaas biedt voor praktische oplossingen van het *Erwinia*-probleem.
- B. Strategisch onderzoek : onderzoek dat op relatief korte termijn mogelijkheden biedt tot praktische oplossingen voor het *Erwinia*-probleem en breder toepasbaar is bv. voor andere bacterieziekten
- C. Toegepast onderzoek: onderzoek specifiek gericht op snelle toepassingen voor en door de sector: Deltaplan C.

Het in dit rapport beschreven onderzoek valt in categorie C; een aantal zaken vielen deels in B zoals het nader karakteriseren van *Erwinia*-isolaten, onderzoek naar alternatieve middelen tegen *Erwinia* zoals antagonisten en plantversterkende middelen (elicitors). Algemeen wordt erkend dat het *Erwinia*-probleem in zowel de Nederlandse pootgoedteelt in hoge mate een “ongrijpbaar” karakter heeft. Dit geldt in vergelijkbare mate voor de bollenteelt. Door aanpassing van de werkwijze en gebruikmakend van de huidige kennis kan het probleem in de bloembollen enigszins worden beheerst, maar er leven nog veel vragen. Het sectoronderzoek in Deltaplan C geniet waardevolle input van op degelijk wetenschappelijk werk berustende expertise bij PRL en PPO. Daarbij: de aanwijzingen die bestaan voor optredende variatie in bacterieziek veroorzakende *Erwinia* en het noodzakelijke onderzoek om hierin klaarheid te brengen zijn gewasoverschrijdend. Ook in diverse bolgewassen anders dan hyacint, Zantedeschia of Dahlia bestaan *Erwinia*-problemen.

Deltaplan C heeft een hoge mate van toepassingsgerichtheid met als doel toepasbaar te zijn voor en door de praktijk.

De resultaten van het onderzoek moeten voor de bloembollensector na 2012 leiden tot het terugdringen van het percentage *Erwinia* in de productieketen door o.a. het keuren van werkbollen of partijen bollen op *Erwinia*. Dit kan zijn door praktische tools zoals toetsen of adviezen, maar ook door informatie via vakbladartikelen of bijeenkomsten te verzorgen.

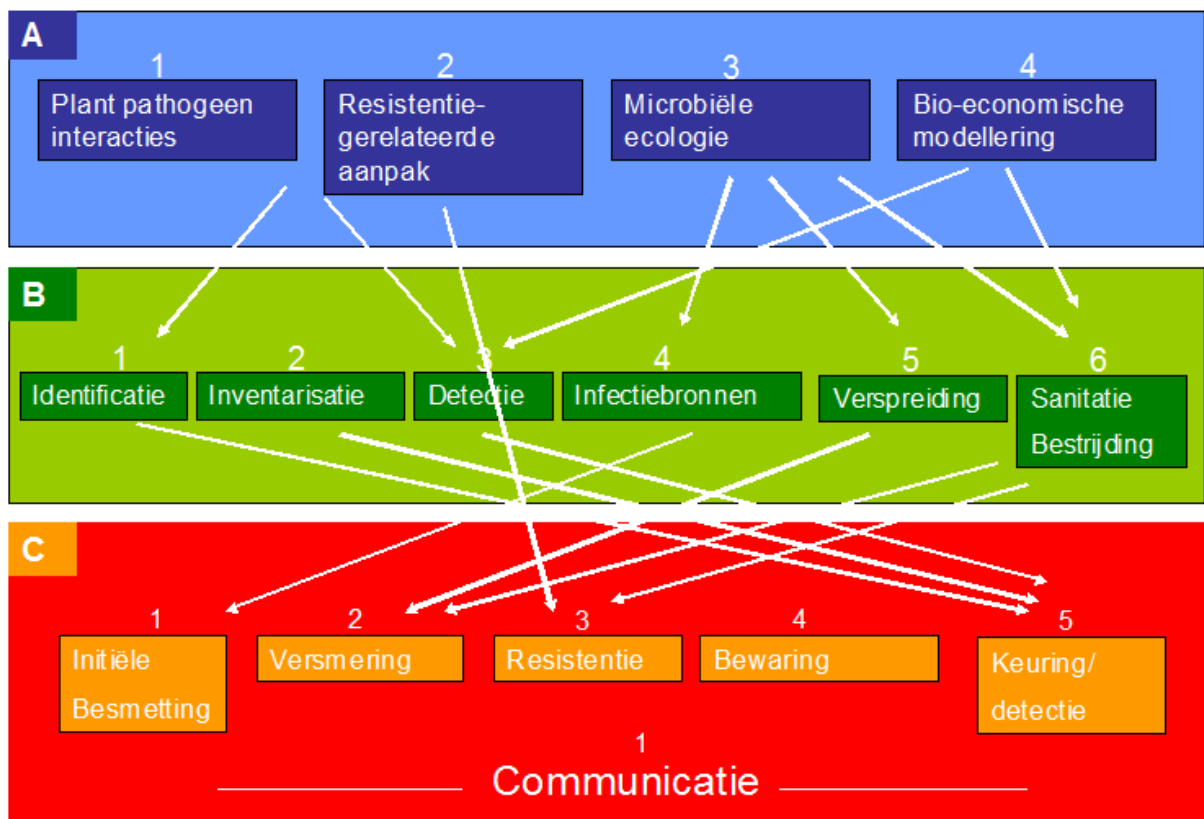


Fig.0. De ABC-formule van het Deltaplan *Erwinia*, met aangegeven het Deltaplan C-deel voor de aardappelsector. Voor deel C van de Bloembollensector zie hieronder.

Voorafgaand aan het Deltaplan C werd in 2008 het project “beheersing van *Erwinia* in bolgewassen” afgerond (PT12683). De focus van dit project was om vast te stellen waar nu de belangrijkste bronnen van *Erwinia*-besmetting vandaan kwamen en op welke momenten *Erwinia* toeslaat, om welke *Erwinia*’s (soorten, typen) het gaat, en preventieve beheersing van aantasting in de keten. Een belangrijke bijdrage uit dit project was de poster “Zo voorkom je een aantasting door *Erwinia*”.

Een nauw aan dit project gerelateerde studie was het project “Snelle toetsen zuur, snot en bolrot”, PT13373. Binnen dit project is voor het onderdeel “snot” een doe-het-zelf toets ontwikkeld voor telers van hyacinten om de aanwezigheid van latente besmettingen met *Erwinia*’s vast te stellen, berustend op de toepassing van stress via mechanische beschadiging en hoge temperaturen. Tevens is in samenwerking met BKD en NAK een pilot studie uitgevoerd naar de toepassing van een DNA toets, ontwikkeld door de NAK op *Erwinia*’s in hyacint (Pilot toetsing op *Erwinia* in hyacint, PT13771) en de mogelijkheden op toetsing van andere soorten bolgewassen op *Erwinia*’s (project protocollering van toetsen op *Erwinia*, PT13061). Ook uit andere projecten werd aanvullende informatie verkregen over *Erwinia* en andere rotveroorzakende bacteriën zoals *Pseudomonas* (projecten “Slijmstelen bij Zantedeschia”, PT 12804-2, 2009 en “Vervolgonderzoek slijmstelen bij Zantedeschia”, PT 13751, 2011).

In dit project deel C zijn de volgende deelonderwerpen onderzocht op verzoek van de begeleidingscommissie bij de start in 2008:

1. Enquête naar ervaringen met *Erwinia*-problemen bij hyacint over de afgelopen jaren.

2. Het verder ontwikkelen van gevoelige toetsen op *Erwinia* (mogelijk specifiek voor *Dickeya* of *Pectobacterium*-soorten die voorkomen in bepaalde bolgewassen) om betrouwbare en specifieke *Erwinia*-monitoring goed te kunnen waarborgen. Dit betreft lab. toetsen en (beperkt) toetsen op en door de bedrijven zelf. Dit zal deels ook in het strategisch onderzoek (niveau B) samen met PRI worden uitgevoerd. Onderzoeken of er ook andere organismen (bacteriën of schimmels) rot kunnen veroorzaken of dit samen met *Erwinia* doen (aandacht voor o.a. de bacterie *Pseudomonas*); Het monitoren van partijen o.a. door onderzoek naar VNTR's en bepalen van waardplantspecificiteit van verschillende *Dickeya* soorten.
3. Het testen of er meer resistente cultivars voorkomen in het sortiment (vooral bij Dahlia en Zantedeschia);
4. Het produceren van *Erwinia*-vrij uitgangsmateriaal, het volgen hiervan in de teelt en de rest van de keten via monitoring op *Erwinia* en vaststellen waar eventuele besmetting vandaan komt;
5. Het vinden van (alternatieve) middelen (bij voorkeur zonder water) en methoden om *Erwinia* te beheersen (o.a. zéér snelle droging bij vermeerdering). Met name in de verwerking (onderzoek naar verspreiding o.a. bij drogen in kisten en daarbij veroorzaken van latente infecties via aerosolen; invloed van snelheid drogen, duur, temperatuur, en vocht op het infectieproces);
6. Samenwerking met de pootgoedaardappelenbranche om gebruik te maken van de wederzijdse kennis: communicatie om efficiënter onderzoek te doen en gegevens uit te wisselen; kennisdeling via vakbladartikelen, lezingen en bijeenkomsten (Open dagen);

Gebruikte afkortingen

Erwinia's = zowel *Dickeya* spp. als *Pectobacterium* soorten

Witsnot = *Erwinia carotovorum* = *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)

Agressief snot = Echr = *Erwinia chrysanthemi* = *Dickeya* spp. In bloembollen tot nu toe alleen de soorten *solani*, *dadantii* of *dianthicola*

2 Enquête hyacinten telers: problemen met *Erwinia*

2.1 Inleiding

Agressief snot veroorzaakt door *Erwinia chrysanthemi* (nu *Dickeya*) komt sinds 2003 vrij algemeen in bloembolgewassen voor. Wanneer de eerste problemen zijn opgetreden is onbekend. De directe schade door uitval van bollen en het extra werk bij de telers en de schade bij de handel mede door een slecht imago van de hyacint is zeer groot.

Er is in de afgelopen jaren vanuit onderzoek (project beheersing *Erwinia*) en praktijkberichten veel bekend geworden over deze ziekte. Bekend is dat veel maatregelen tegelijkertijd in de hele keten nodig zijn om een aantasting te voorkomen of te beperken. Deze worden op de bedrijven met soms wisselend succes toegepast. De aantasting komt echter nog te vaak voor.

Ook in de pootaardappelteelt is de schade zeer groot. In het onderzoek wordt de komende jaren samengewerkt met de aardappelsector (Deltaplan *Erwinia*) en wordt gestreefd naar extra (deels door de overheid betaald) fundamenteel en strategisch onderzoek.

Door middel van een enquête onder hyacintentelers wilden we graag een goed inzicht krijgen in de ervaringen die telers hebben met agressief snot en de effectiviteit van door hen genomen maatregelen. Belangrijk is te weten **welke maatregelen effectief** zijn en welke **vragen over *Erwinia*** er nog leven. Vragen die mogelijk beantwoord kunnen worden vanuit bestaande kennis (onderzoek en praktijkervaring) en dus met voorlichting moeten worden opgelost of waarvoor nog onderzoek nodig is. Zo kunnen naast onderzoeksresultaten ook ervaringen van telers helpen om agressief snot te bestrijden en daarmee de positie van de hyacint in de teelt en handel weer te verbeteren. Tevens zullen gegevens uit de enquête onderzoeksvragen kunnen oproepen of aanscherpen.

2.2 Opzet

De enquête is mei 2009 naar 185 adressen verstuurd. Daarvan zijn er 60 terug ontvangen: 58 geheel of deels ingevulde formulieren waren bruikbaar. Er kwamen 31 formulieren uit De Zuid, 20 uit de Noord en van 7 is de herkomst niet bekend. De respons was hiermee vergelijkbaar met de veel uitgebreidere enquête die in 2003 werd gehouden (Van Doorn et al. 2008). De gestelde vragen staan vermeld bij de resultaten (vetgedrukte tekst, hoofdstuk 2.3).

2.3 Resultaten

De resultaten van de enquête staan samengevat in de tabellen 2.1 t/m 2. 29.

1. Kunt u agressief snot goed onderscheiden van witsnot?

Ingevuld door 88% = 51 bedrijven

Tabel 2.1.

Kan onderscheid maken tussen agressief snot en witsnot	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Nee	14	27
ja	12	35
ziet verschil op veld	14	27
ziet verschil in schuur	35	69
niet op veld, maar wel in schuur	18	24

2. Wanneer denkt u dat er voor het eerst agressief snot is opgetreden?

Ingevuld door 62% =36 bedrijven

Veel (17) bedrijven hebben hun eigen eerste keer ingevuld en daarbij werden 2005 en 2006 het vaakst genoemd. Als die antwoorden buiten beschouwing worden gelaten, dan worden 1994 (aardappel), 1995 (Muscari), 1996, 1998, 1999, 2000, 2002, 2003, 2004, 2005 en 2006 (hyacint) genoemd.

3. Heeft u wel eens een aantasting gehad door agressief snot in hyacint?

Ingevuld door 95% =55 bedrijven

Tabel 2.2.

Agressief snot gehad	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
nee, nergens last	5	9
nee, maar wel van witsnot	13	24
Ja	35	64

4. In welke jaren heeft u een aantasting door agressief snot gehad in een of meer partijen?

Ingevuld door 60% =35 bedrijven

Tabel 2.3.

Jaar van aantasting	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld		
		% weinig last	% veel last	% erg veel last
2000	3	67	0	33
2001	3	67	33	0
2002	3	33	67	0
2003	6	33	33	33
2004	8	63	38	0
2005	17	65	35	0
2006	22	59	27	14
2007	26	65	23	12
2008	21	81	10	10

Tabel 2.4.

Aantal jaar met agressief snot op bedrijf	% bedrijven (van de 35)
1	21
2	15
3	32
4	18
5	6
6	3
7	0
8	0
9	6

Er waren 21 bedrijven die ook cultivars noemden. Soms werd een cultivar meerdere jaren genoemd. De genoemde cultivars die door die bedrijven één of meer keer genoemd werden staan in tabel 5.

Tabel 2.5.

Cultivar	Door bedrijven één of meer keer genoemde cultivars
Delft Blue	10
Carnegie	7
Pink Pearl	3
Blue Star	3
Jan Bos	2
Anna Marie	2
White Pearl	2

Overige 1x genoemde cultivars: Ostara, Blue Pearl, Blue Jacket, Pink Surprise, Purple Sensation, Fondant, Anna Liza en Aiolos.

5. Is de ernst van de aantasting tussen 2003 en 2008 veranderd?

Ingevuld door 57% = 33 bedrijven

Tabel 2.6.

Ernst aantasting tussen 2003-2008	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Afgenomen	14	42
Gelijk gebleven	4	12
Toegenomen	4	12
Per jaar verschillend	11	33

6. Kunt u aangeven hoe de mate van aantasting in uw partijen is geweest in 2008?

Ingevuld door 64% = 37 bedrijven

Tabel 2.7.

Aantasting partijen 2008	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld	% van de bedrijven met aantasting	% bedrijven met een of meer partijen met
Geen aantasting	11	30		
Minder dan 3% aantasting	3	8	12	30
Met 3-5% aantasting	3	8	12	22
Met 5-10% aantasting	3	8	12	16
Met meer dan 10% aantasting	7	19	27	22
meerdere %% aantasting	10	27	37	27

7. Als u een aantasting heeft in een partij, waar of wanneer ziet u die aantasting dan?

Ingevuld door 60% = 35 bedrijven (meerdere antwoorden mogelijk)

Tabel 2.8.

Aantasting zichtbaar	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Bolmaat	14	40
Jaargang	15	43
Cultivar	14	40
Herkomst		
eigen/aankoop plantgoed	9	26
eigen/aankoop werkbollen	14	40
eigen/aankoop broei	3	9
Overig	2	6
Plaats		
Tuin	6	17
gebied/streek	17	49
Overig	0	0
niet specifiek	3	9
Verwerking		
Beregenen	4	11
Rooien	10	29
Drogen	8	23
Schonen	9	26
Sorteren	25	71
Tellen	13	37
na afleveren	14	40
Heetstook	6	17
Ontsmetten	1	3
Afbroei	0	0
Overig	3	9
Tijdstip		
op het veld	11	31
bij rooien	10	29
tijdens bewaring	17	49
tijdens/na verwerking	22	63
tijdens/na heetstook	11	31
bij planten	6	17
Overig	2	6
bij afnemer	3	9
bij broei	2	6
Overig	1	3

Een aantal bedrijven gaf nog een nadere toelichting bij antwoorden:

-Bolmaat: vooral leverbaar, enkele keer ook kleinere maat

-Jaargang: vooral oudere jaargangen, enkele keer ook pluis

-Cultivars: als er cultivars werden genoemd waren dit vooral de regelmatig genoemde Delft Blue en Carnegie.

-Herkomst: meestal eigen plantgoed, eigen en aankoop broei en meestal aankoop bij werkbollen

-Tuin: vooral de nattere tuinen

-Streek: 8 x De Noord, 4 x De Zuid, 3x Frankrijk en 1 x Drenthe

Bij overige onder kopjes herkomst, verwerking en tijdstip werden veelal algemene opmerkingen en enkele specifieke ervaringen gemeld.

8. Kunt u voor u zelf aangeven waarom u een aantasting heeft gehad?

Ingevuld door 60% = 35 bedrijven (meerdere antwoorden mogelijk)

Tabel 2.9.

Oorzaak aantasting bekend	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Nee	14	40
Soms	17	49
Vaak	2	6
Altijd	5	14

Door bedrijven genoemde oorzaken staan in Tabel 10:

Tabel 2.10.

Door bedrijven genoemde oorzaken	aantal x genoemd
Werkbollen besmet	9
Weersomstandigheden	3
Verwerking	3
Aankoop	2
Beregenen	2
Overige o.a	
spoelen/tuin/partij/drogen/ontsmetten voor heetstook	1

9. Welke maatregelen zijn bij u zeer effectief gebleken om een aantasting te beperken?

Ingevuld door 93% = 54 bedrijven

Tabel 2.11.

Effectieve maatregel (aantal keer genoemd)	
Uitgangsmateriaal	gezonde werkbollen kopen, eventueel laten testen (7)
Veld	niet te veel stikstof en/of vroeg strooien (4) niet beregenen (4) lichte tuin (2) koper spuiten, koel telen, selectie (elk 1)
Rooien	vroeg rooien (8) rooiomstandigheden (5) op voorraad rooien (4) in gaasbak (9)
Drogen	gaasbak drogen (6) zo snel mogelijk op lucht (9) koel drogen (8)
Verwerken	plantgoed gelijk na rooien scheiden (1) zo laat mogelijk verwerken (12) koele omstandigheden (11) koel bewaren /niet te snel naar hogere temp (3) nadrogen (4) voorkomen beschadiging (20) sorteren plantgoed na heetstook (3) minder heetstoken (1) maar ook gebruik heetstook als selectie (1) ruimtebehandeling (1)
Ontsmetten	niet ontsmetten/niet op voorraad ontsmetten (3)
Selectie	uitzoeken / pas bij opplant uitzoeken / voorzichtig uit bak uitzoeken / partijen apart zetten (totaal 7)
Hygiëne	machines schoonmaken (2)

10. Kunt u aangeven welke de belangrijkste maatregelen zijn?

Ingevuld door 78% = 45 bedrijven

Tabel 2.12.

Belangrijkheid van effectieve maatregelen aangegeven	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Nee	21	47
Ja	24	53

11. Welke maatregelen heeft u genomen die geen effect hadden?

Ingevuld door 40% = 23 bedrijven

Tabel 2.13.

Maatregelen die geen effect hadden (aantal keer genoemd)
Bolontsmetting (3)
Uitzoeken (3)
Ruimtebehandeling toepassen (3)
Minder bemesting/N geven (2)
Lage temperatuur toepassen (2)
Heetstoken/vroeg rooien/meer lucht geven /minder beschadigen/op voorraad rooien (elk 1)

12. Zijn er ook maatregelen die u wel belangrijk vindt, maar die op uw bedrijf niet uitvoerbaar zijn?

Ingevuld door 78% = 45 bedrijven

Tabel 2.14.

Belangrijke maar niet uitvoerbare maatregelen	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Nee	28	62
Ja	17	38

Tabel 2.15.

Belangrijke maatregelen, maar niet uitvoerbaar (aantal keer genoemd)
In gaasbakken rooien /opraperen na op voorraad rooien (8)
Zonder schade verwerken (4)
Laat of na heetstook sorteren (2)
Bij lage temperatuur sorteren / gescheiden houden van partijen of Plekken / natte slootkanten vermijden (elk 1)

13. Worden er door collega's, voorlichting en/of onderzoek maatregelen genoemd die u niet belangrijk vindt?

Ingevuld door 72% = 42 bedrijven

Tabel 2.16.

Genoemde, maar niet belangrijke maatregelen	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Nee	35	83
Ja	7	17

Slechts enkele zaken werden éénmaal genoemd: lage temperatuur toepassen, ontsmetten, langzaam drogen, minder bemesten, partijen toetsen en heetstook verspreidt *Erwinia*. De bron was daarbij een collega teler of werd niet genoemd.

14. Worden er door collega's, voorlichting en/of onderzoek maatregelen genoemd die wel werken tegen *Erwinia*, maar (te) veel nadelen hebben?

Ingevuld door 66% = 38 bedrijven

Tabel 2.17.

Maatregelen met te veel nadelen	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Nee	26	68
Ja	12	32

Tabel 2.18.

Maatregelen met teveel nadelen
In gaasbakken rooien (6)
Sorteren bij lage temperatuur (3)
Rooien uitstellen/karton in gaasbak/opraperen (elk 1)

15. Welke maatregel (-en) zou (-den) meer aandacht moeten krijgen bij collega's, voorlichting en/of onderzoek?

Ingevuld door 57% = 33 bedrijven

Tabel 2.19.

Maatregelen die meer aandacht verdienen (aantal keer genoemd)
Gezonde werkbollen, zieke partijen weggooien, krimpen/saneren (11)
Teelt: keuze tuin, bemesting, vruchtwisseling (2)
Niet spoelen, niet beregenen of juiste tijdstip van beregenen en watertemperatuur sloot ivm. verspreiding (3)
Te kleine verwerkingscapaciteit bij (te grote) bedrijven (2)
Rooien op juiste moment en goede omstandigheden, beschadiging voorkomen (3)
In gaasbakken rooien en op veld drogen (2)
Goed drogen, droogproces en droogtemperatuur (5)
Beschadiging voorkomen (7)
Koel verwerken (3)
Plantgoed verwerking sorteren na heetstook; geen leverbaar uit plantgoed (4)

16. Wat zijn de vragen waarop u een antwoord wilt hebben bijv. vanuit onderzoek.?

Ingevuld door 47% = 27 bedrijven

Tabel 2.20.

Vragen die leven (aantal keer genoemd)
Waar komt de aantasting oorspronkelijk vandaan (5)
Hoe komt het (weer) in de partij, in grond, in kisten (5)
Behoeft een betrouwbare toets (5)
Hoe krijg je gezond uitgangsmateriaal, is een besmetting partijgebonden? (elk 1)
Is er een betere droging mogelijk (3)
Besmet en hoe moet je daar dan mee omgaan bij verwerking, bewaring, heetstook (5)
Zijn er middelen (dompel en ruimtebehandelingen) die werken mede ivm mogelijke verdwijning formaline (3)
Invloed waterhuishouding en bemesting, variatie tussen jaren en late aantasting in de broei (elk 1)

17. Bollen kunnen er gezond uitzien maar toch een besmetting bij zich dragen. Als er een toets is die deze latente besmetting kan aantonen, zou u daar gebruik van maken?

Ingevuld door 78% = 45 bedrijven (meerdere antwoorden mogelijk)

Tabel 2.21.

Gebruik toets bij	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Verkoop werkbollen	13	29
Teelt eigen werkbollen	19	42
Koop werkbollen	31	69
Verkoop leverbaar	4	9
Koop leverbaar	6	13
Verkoop plantgoed	1	2
Koop plantgoed	11	24
Gebruik geen toets	1	2

Opmerkingen die erbij gemaakt werden:

- de toets moet wel betrouwbaar en betaalbaar zijn,
- alle telers moeten aan de toets mee betalen,
- toets is alleen goed voor eigen inzicht,
- er zou een schoonverklaring voor leveranciers moeten komen.

18. Hoe is uw ervaring met betrekking tot heetstoken en invloed op een aantasting?

Ingevuld door 71% = 41 bedrijven (meerdere antwoorden mogelijk)

Tabel 2.22.

Invloed heetstook op aantasting	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Geen	24	59
Minder aantasting	3	7
Meer aantasting tijdens heetstook	12	29
Meer aantasting na heetstook	6	15
Kan latente besmetting zichtbaar maken	3	7

19. Is er verschil in cultivargevoeligheid voor agressief snot?

Ingevuld door 66% = 38 bedrijven (meerdere antwoorden mogelijk)

Tabel 2.23.

Cultivargevoeligheid	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Is er niet	11	29
Er zijn erg gevoelige	19	50
Er zijn gevoelige	11	29
Er zijn ongevoelige	4	11
Bedrijven die aangeven dat er verschil is in gevoeligheid	27	71

20. Kent u partijen, herkomsten, enz, waarin u nooit een aantasting heeft gezien?

Ingevuld door 81% = 47 bedrijven

Tabel 2.24.

Partijen/herkomsten waarin nooit een aantasting gezien	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Nee	21	45
Ja	26	55

Tabel 2.25.

Cultivar	erg gevoelig	gevoelig	ongevoelig	nooit gezien
Delft Blue	6	3	1	1
Blue Star	1	1		1
Carnegie	6			
Anna Marie	3	1		
Antarctica	1			
Aiolos	2			
Blue Pearl	2			3
Pink Pearl	1	2	1	8
White Pearl		1	1	7
Pink Surprise		1		
Blue Jacket	1			
Jan Bos	1			
Fondant	1		1	3
L'Innocence	1			
witsnotgevoelig	2			
witschalig	1	2		
grofwortelig	1			
Gypsy Princess				1
City of Haarlem				3
Minos				2
Purple Star				1
eigen kraam				4
(andere werkbollen leverancier				2
Pluis van gehoud				1

21. Teelt u ook andere gewassen die door *Erwinia* aangetast kunnen worden?

Ingevuld door 86% = 50 bedrijven

Tabel 2.26.

Teelt van andere <i>Erwinia</i> gevoelige gewassen	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
Nee	40	80
Ja	10	20

22. Kent u de oorzaken van een aantasting in hierboven genoemde gewassen?

Ingevuld door 60% = 35 bedrijven

Tabel 2.27.

Oorzaken van aantasting in andere gewassen	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
niet bekend	31	89
Ja	4	11

Tabel 2.28.

Gewas en mate van aantasting in de afgelopen jaren (aantal keer genoemd)
Zantedeschia, zonder aantasting (3)
Iris zowel gelijk, afnemend als partij opgeruimd (3)
Muscari gelijk (2)
Freesia gelijk (1)
Triteleia geen (1)
Dahlia afgenomen (1)

23. Weet u waarom u geen aantasting meer heeft in hierboven genoemde gewassen?

Ingevuld door 55% = 32 bedrijven

Tabel 2.29.

Reden geen aantasting in andere gewassen	aantal bedrijven ingevuld	% bedrijven ingevuld
niet bekend	26	81
Ja	6	19

Genoemde redenen van aantasting: besmette partij, spoelen, beschadiging, te warme verwerking, te natte tuin en te veel bemesting.

24. Heeft u nog vragen over de andere voor *Erwinia* gevoelige gewassen?

Ingevuld door 10% = 6 bedrijven

Er waren vier vragen over de relatie tussen de diverse bolgewassen en aardappel.
Er was één vraag waarom de aantasting bij iris minder agressief is en de bollen minder leeglopen.

25. Als u nog aanvullingen heeft op eerdere vragen, opmerkingen wil maken, ervaringen wil delen etc, kunt u dat hier doen.

Ingevuld door 38% = 22 bedrijven

De aanvullingen waren veelal een benadrukking van ervaringen en eerder gegeven antwoorden.

2.4 Conclusies

De respons was redelijk goed. De meeste bedrijven vulden de enquête in met naam en adres. Zowel de Noord als de Zuid zijn vertegenwoordigd. Niet alle vragen waren door iedereen ingevuld. Er werden gegevens van 58 bedrijven gebruikt.

1. Kunt u agressief snot goed onderscheiden van witsnot?

Agressief snot wordt in de schuur meestal wel herkend i.t.t. op het veld.
Het onderscheid is voor veel bedrijven toch moeilijk, hetgeen overigens ook in het onderzoek het geval is.

2. Wanneer denkt u dat er voor het eerst agressief snot is opgetreden?

Over het jaar dat agressief snot voor het eerst is gezien verschillen de meningen, waarbij ook diverse jaren uit de jaren '90 werden genoemd. Er werden ook andere gewassen genoemd naast hyacint.

De vraag bleek niet goed gesteld omdat een aantal bedrijven het jaar noemde dat zij er op het eigen bedrijf voor het eerst last mee kregen.

3. Heeft u wel eens een aantasting gehad door agressief snot in hyacint?

64% heeft wel eens problemen met agressief snot, 24% alleen met witsnot en 9 % heeft totaal geen last van agressief snot of witsnot.

Dit geeft wel aan dat het voor de meeste bedrijven een probleem is en dat er slechts weinigen zijn die hyacinten kunnen telen zonder last te hebben van witsnot of agressief snot. Daarnaast blijkt dat er nog steeds bedrijven zijn die het tot dan toe (mei 2009) nog nooit gehad hebben. Overigens hoor je elk jaar wel weer van een bedrijf dat ze dat jaar pas voor het eerst last hadden van agressief snot en dan pas echt beseffen wat voor "ramp" dat is.

4. In welke jaren heeft u een aantasting door agressief snot gehad in een of meer partijen?

De aantasting kwam bij de meeste bedrijven voor vanaf 2005.

20-65% van de bedrijven die een aantasting hadden in een jaar, gaven aan dat ze daar veel tot erg veel last van hadden.

21% heeft 1 en 15% heeft 2 jaar een aantasting gehad en dus 64% van de bedrijven die last hadden, hadden 3 of meer jaren een aantasting.

Dit geeft aan dat als je het op je bedrijf hebt, je het meestal meerdere jaren hebt, maar dat er ook incidentele gevallen bekend zijn. De cijfers laten zien dat de meeste bedrijven na een eerste aantasting ook de jaren daarna te maken hebben met een aantasting. Als bedrijf kom je er blijkbaar moeilijk weer vanaf.

5. Is de ernst van de aantasting tussen 2003 en 2008 veranderd?

De ernst was bij 42% afgenomen en bij 12% toegenomen. Bij 33% was de aantasting per jaar erg wisselend.

Dat bij veel bedrijven de aantasting afneemt geeft aan dat de bedrijven kans zien om de aantasting te beheersen.

6. Kunt u aangeven hoe de mate van aantasting in uw partijen is geweest in 2008?

30% (11) van de bedrijven had geen aantasting in 2008, maar ook 27% van de bedrijven met een aantasting had één of meerdere partijen met meer dan 10% aantasting.

Duidelijk is dat de aantasting zeer ernstig kan zijn.

7. Als u een aantasting heeft in een partij, waar of wanneer ziet u die aantasting dan?

Een aantasting kwam veel voor in bep. cultivars, grotere maten en oudere jaargangen en daarnaast vaak in eigen plantgoed, in aankoop werkbollen en De Noord werd vaker genoemd dan De Zuid. Opvallend vaak werd ook Frankrijk genoemd.

De verwerking vanaf rooien en daarna het sorteren en tellen/afleveren werden veel genoemd. Bij het plantgoed ook bij/na heetstook. Opvallend toch ook veel meldingen van zichtbaar zijn op het veld.

8. Kunt u voor u zelf aangeven waarom u een aantasting heeft gehad?

Meestal was de oorzaak niet bekend (40%). Bij 17 bedrijven was het soms bekend en bij 7 bedrijven was de oorzaak duidelijk, waarbij het meest genoemd werden: werkbollen, weer en verwerking.

9. Welke maatregelen zijn bij u zeer effectief gebleken om een aantasting te beperken?

Effectieve maatregelen die minimaal 5 x werden genoemd waren: gezond uitgangsmateriaal (7) en selectie/ voorzichtig uitzoeken (7), juiste rooiomstandigheden (5), rooien/drogen in gaasbakken (9+6) snel en goed drogen, laat (12) en/of koel (11) verwerken en vooral ook schade voorkomen (20).

Opvallend is dat ook niet beregenen (4) wordt aangegeven. Dit is een bekende oorzaak voor witsnot en het is nog niet duidelijk voor agressief snot.

10. Kunt u aangeven welke de belangrijkste maatregelen zijn?

Ongeveer de helft van de bedrijven heeft dit aangegeven.

Veelal was dit een aantal maatregelen vanaf rooien tot en met afleveren in de loop van de tijd weergegeven.

11. Welke maatregelen heeft u genomen die geen effect hadden?

Niet effectief waren vooral (3x genoemd): ontsmetting, uitzoeken en ruimtebehandeling. Van ontsmetting en uitzoeken is al vaker gezien dat na deze behandeling weer een (nieuwe) aantasting optreedt.

12. Zijn er ook maatregelen die u wel belangrijk vindt, maar die op uw bedrijf niet uitvoerbaar zijn?

De meeste bedrijven vonden dat de meeste maatregelen wel toepasbaar waren, maar 17 bedrijven vonden o.a. de volgende maatregelen niet uitvoerbaar: op voorraad rooien/ in gaasbakken werken (8) en zonder schade verwerken (4). In gaasbakken werken vinden een aantal bedrijven niet meer van deze tijd, qua mechanisatie.

13. Worden er door collega's, voorlichting en/of onderzoek maatregelen genoemd die u niet belangrijk vindt?

Door 7 bedrijven werd een aantal maatregelen benoemd die door allen slechts één keer werden genoemd en meestal was een andere teler de bron. Er stonden ook maatregelen bij die bij anderen wel werkten.

14. Worden er door collega's, voorlichting en/of onderzoek maatregelen genoemd die wel werken tegen *Erwinia*, maar (te) veel nadelen hebben?

Door 12 bedrijven werden o.a. genoemd in gaasbakken rooien (6) en bij lage temperatuur bollen sorteren (3).

Genoemde maatregelen passen goed minder in de gangbare werkwijze op die bedrijven.

15. Welke maatregel(en) zou(den) meer aandacht moeten krijgen bij collega's, voorlichting en/of onderzoek?

33 bedrijven wilden meer aandacht voor: oa. gezond uitgangsmateriaal, krimpen/saneren (11), goed drogen (5), beschadiging voorkomen (7), lage temperatuur bij verwerking (3) en plantgoed na de heetstook sorteren (4). Opvallend duidelijk was de roep om gezond te starten, desnoods via eerst saneren.

16. Wat zijn de vragen waarop u een antwoord wilt hebben bijv. vanuit onderzoek enz.?

Veel vragen kwamen neer op waar een aantasting vandaan komt en hoe je dit voorkomt. Daarnaast vragen over het drogen en de roep naar een middel o.a. ter vervanging van formaline.

Deze vragen worden in de verschillende publicaties en lezingen regelmatig beantwoord voor zover daar nu een antwoord op te geven is. Het antwoord stelt niet altijd gerust.

17. Bollen kunnen er gezond uitzien maar toch een besmetting bij zich dragen. Als er een toets is die deze latente besmetting kan aantonen, zou u daar gebruik van maken?

Vrijwel alle bedrijven zouden een toets, mits betrouwbaar en betaalbaar, willen inzetten bij aankoop (69%), teelt (42%) en verkoop (29%) werkbollen maar ook bij koop (24%) plantgoed en leverbaar (13%).

De praktijk (zomer 2010) leert echter dat men nog niet staat te springen bij het (laten) uitvoeren van de toets. Vaak wil men wel van een zieke bol weten welke *Erwinia*-soort de oorzaak is.

18. Hoe is uw ervaring met betrekking tot heetstoken en invloed op een aantasting?

De heetstook heeft volgens een kleine meerderheid meestal geen invloed. Veel bedrijven zien ook een toename van de aantasting en soms zelfs de heetstook als middel tot selectie op latent aanwezige besmetting.

19. Is er verschil in cultivargevoeligheid voor agressief snot? en 20. Kent u partijen, herkomsten, enz, waarin u nooit een aantasting heeft gezien?

Er is een groot verschil van mening over de mate van gevoeligheid van de cultivars. Sommige cultivars worden zowel als erg gevoelig als ongevoelig/nooit gezien aangemerkt (Delft Blue, Pink Pearl, Blue Pearl en Fondant).

Veel (minimaal 3x) genoemde (erg) gevoelige cultivars zijn Delft Blue (9), Carnegie (6), Anna Marie (4) en Pink Pearl (3). Daarnaast werden witsnotgevoeligheid en witschaligheid genoemd.

Genoemd als ongevoelig/nooit gezien (minimaal 3x) zijn o.a. Pink Pearl (9), White Pearl (8), Fondant (4), Blue Pearl (3) en City of Haarlem (3).

De conclusie is, dat naast een zekere gevoeligheid van een cultivar een partij-invloed een grote rol speelt.

21. Teelt u ook andere gewassen die door *Erwinia* aangetast kunnen worden? 22. Kent u de oorzaken van een aantasting in hierboven genoemde gewassen? 23. Weet u waarom u geen aantasting meer heeft in hierboven genoemde gewassen?

10 bedrijven teelden ook andere *Erwinia*-gevoelige gewassen, waarbij de oorzaak van een eventuele aantasting meestal niet duidelijk was. Gegeven oorzaken kwamen overeen met die bij hyacint. Het spoelen na rooien werd daarbij ook nog genoemd. De mate van aantasting in de afgelopen jaren was gelijk gebleven of werd minder.

24. Heeft u nog vragen over de andere voor *Erwinia* gevoelige gewassen?

De meeste vragen gingen over de relatie tussen de verschillende gewassen.

25. Als u nog aanvullingen heeft op eerdere vragen, opmerkingen wil maken, ervaringen wil delen etc, kunt u dat hier doen.

De aanvullingen waren veelal een benadrukking van ervaringen en eerder gegeven antwoorden.

2.5 Samenvatting en discussie

Het onderscheid tussen witsnot en agressief snot in hyacinten was voor veel van de telers moeilijk. Tweederde van de bedrijven had vooral vanaf 2005 last van agressief snot waarbij de ernst in de loop der jaren meestal wel afnam, maar men kwam er niet geheel van af. De door het *Erwinia*-onderzoek bekend geworden informatie over agressief snot heeft op de bedrijven wel geleid tot vermindering van de aantasting. Opvallend is, dat er al in de 90-er jaren melding wordt gemaakt van agressief snot. Hier heeft PPO geen isolaten van.

In 2008 had 25% van de bedrijven minimaal met 1 partij met 10% of meer aantasting te maken; slechts een klein aantal had nooit last van enige vorm van snot. Deze telers zijn van groot belang om nader gevisiteerd en bevraagd te worden. Indien aantasting werd aangetroffen, dan trad deze meestal op tijdens de bewaring in oudere partijen van bepaalde cultivars.

Sommige cultivars werden zowel erg gevoelig als ongevoelig genoemd; dit fenomeen duidt dan op vooral partijbesmettingen. De oorzaak kon men moeilijk aangeven, maar genoemd werden de aspecten verwerking, het weer en de kwaliteit van werkbollen.

Veel genoemde effectieve maatregelen ter voorkoming van een aantasting waren: beschadiging voorkomen, laat en koel verwerken, met gaasbakken werken, gezonde werkbollen gebruiken en voorzichtig uitzoeken. Sommige van deze maatregelen werden echter ook door enkele bedrijven als niet uitvoerbaar gezien. Het aantal genoemde niet-effectieve maatregelen was kleiner: o.a. ontsmetting, uitzoeken en een ruimtebehandeling.

Bedrijven vonden dat er meer aandacht zou moeten zijn voor gezond uitgangsmateriaal, het areaal saneren, beschadiging voorkomen, goed drogen, koel verwerken en pas na de heetstook sorteren.

Wat betreft gezond uitgangsmateriaal is onderzoek verricht binnen het project “snelle toetsen op zuur, snot en bolrot” waar zowel een praktijktoets is ontwikkeld als wel een validatie om gepoolde partijen hyacinten bij de NAK te laten toetsen op *Dickeya*.

Vrijwel alle bedrijven (98%) zouden een toets, mits betrouwbaar en betaalbaar, willen inzetten vooral bij werkbollen. Wat betaalbaar is, was niet in de enquête opgenomen; de door de NAK aangeboden toets was toen nog niet bekend.

De meest gestelde vragen betroffen vooral hoe een aantasting te voorkomen en waar de besmetting vandaan komt. Geheel nieuwe vragen omtrent *Erwinia* werden niet aangegeven door de telers.

3 Identificatie en detectie van *Dickeya* en *Pectobacterium* soorten

Om *Dickeya* en *Pectobacterium* in bolgewassen te detecteren wordt gebruik gemaakt van PCR. Generieke primers voor deze PCR zijn in het verleden beschreven door Nassar (1996) en Darasse (1994) voor respectievelijk de detectie van *Dickeya* soorten (*Dickeya* spp.) en *Pectobacterium* soorten (*Pectobacterium* spp). De Adel/Adell primer van Nassar om *Dickeya* te detecteren en de Y1/Y2 primerset van Darasse voor het detecteren van *Pectobacterium* zijn echter niet in staat de verschillende soorten die binnen *Dickeya* en *Pectobacterium* bestaan van elkaar te onderscheiden. In dit hoofdstuk staan de resultaten beschreven van een survey gehouden onder bloembolgewassen over de aanwezigheid van specifieke *Dickeya* soorten in bloembolgewassen. Daarnaast worden in dit hoofdstuk de eerste resultaten beschreven voor karakterisering van *Dickeya* spp en *Pectobacterium* spp middels VNTR's (Variable number of tandem repeats).

3.1 *Dickeya* soorten in bolgewassen

Tot 2009 werd geen onderscheid gemaakt in soorten *Dickeya* (de vroegere *Erwinia chrysanthemi*). Om de verschillende *Dickeya*-soorten te kunnen onderscheiden zijn in 2008 door PRI verschillende TaqMan PCR's ontwikkeld voor o.a. de *Dickeya* soorten *D. solani*, *D. dadantii*, *D. dianthicola* en *D. dieffenbachiae* (persoonlijke mededeling Jan van der Wolf, PRI, 2009). Dezelfde Taqmans kunnen ook worden gebruikt om vast te stellen welke *Dickeya* soorten in bloembolgewassen voorkomen. Hiertoe is een survey gehouden, waarbij voor 22 praktijkmonsters met een vastgestelde besmetting met *Dickeya* via TaqMan PCR de soort is bepaald. De volgende aantallen monsters zijn in de survey mee genomen: hyacint (7x), iris (3x), Muscari (1x), ixia (2x), freesia (2x), narcis (1x), Dahlia (3x), aardappel (1x) en sedum (1x). Een overzicht van de gewassen met de resultaten van de Real-time PCR toets staat weergegeven in Tabel 3.1

Tabel 3.1. Overzicht van het aantal keren dat een bepaalde *Dickeya* soort in een specifiek bolgewas met Real-time PCR werd aangetoond.

waardplant	<i>D.solani</i>	<i>D.dadantii</i>	<i>D.dianthicola</i>
Hyacint	6x	1x	Geen
Iris	Geen	3x	Geen
Muscari	1x	Geen	Geen
Ixia	Geen	2x	Geen
Freesia	Geen	2x	Geen
Narcis	Geen	1x	Geen
Dahlia	Geen	Geen	3x
Aardappel	1x	Geen	Geen
Sedum	Geen	Geen	1x

Zoals uit tabel 3.1 blijkt, werd *D. solani* aangetoond in hyacint, Muscari en aardappel. *D. dadantii* in de gewassen hyacint, iris, Ixia, freesia en narcis. *D. dianthicola* in sedum en Dahlia. De analyses zijn uitgevoerd met een beperkt aantal monsters per gewas.

3.1.1 Conclusie

Op basis van toetsing met TaqMan PCR's kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- hyacint is waard voor *D. solani* en *D. dadantii* maar niet voor *D. dianthicola*,
- Muscari en aardappel kunnen worden aangetast door *D. solani* (van aardappel was dit al bekend).

- Ixia, freesia en narcis worden aangetast door *D. dadantii*.
- Tot dusver lijkt *D. dianthicola* van de binnen dit experiment geteste gewassen alleen in Dahlia en sedum voor te komen.

3.2 Variable number of tandem repeats (VNTR) merkers voor karakterisatie van *Dickeya* en *Pectobacterium* (*Pcc*) tot op isolaatniveau

Binnen het Deltaplan *Erwinia* was een van de opdrachten de diversiteit tussen *Dickeya*-isolaten en die van *Pcc* te bestuderen. Wanneer je *Dickeya*-isolaten van elkaar kan onderscheiden is het mogelijk om op deze wijze de route danwel verspreiding van isolaten te kunnen volgen. Dit met als doel om inzicht te verkrijgen over de verspreidingswijze en het moment van besmetting van partijen op bedrijven.

Een methode die gebruikt kan worden voor identificatie van specifieke isolaten is de VNTR-analyse. Isolaten van eenzelfde bacteriesoort kunnen verschillen in grootte en aantallen van repeterende DNA stukjes in het genoom (Fig.3.1). Op basis van genoom informatie van *Dickeya* en *Pectobacterium* kunnen primers rond deze repeats worden ontworpen, waardoor verschillen met PCR kunnen worden gedetecteerd. Zo kan voor een isolaat een unieke fingerprint (streepjescode) van verschillende repeats ontstaan. Binnen dit projectonderdeel is het gebruik van VNTR's voor het fingerprinten van *Dickeya* spp. enerzijds, en voor *Pcc* anderzijds onderzocht.




Genoom	Schematische weergave genoom	Aantal vntr's
Bacterie A	<i>Isolaat 1</i> 	8
Bacterie B	<i>Isolaat 2</i> 	5
Bacterie C	<i>Isolaat 3</i> 	3

Fig. 3.1. Schematische voorstelling van variatie tussen het genoom (blauwe lijn) van drie bacterie-isolaten van dezelfde soort door het aantal keren dat een zich repeterend stukje DNA (groene pijltjes) bij een isolaat voorkomt: variable number of tandem repeats (VNTRs).

3.2.1 Ontwikkeling van VNTR merkers voor karakterisatie van *Dickeya* soorten tot op isolaat niveau

3.2.1.1 Ontwerpen van VNTR's voor analyse van *Dickeya* isolaten

De genoomsequentie van *D. dadantii* 3937 is gebruikt voor het zoeken naar repeterende stukjes DNA voor *Dickeya*. Het zoeken naar specifieke stukjes repeterend DNA vond plaats met het programma tandem repeat finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). Hierbij werden de volgende selectie criteria aangehouden:

- het aantal nucleotiden van het repeterende stukje DNA (motief) moest minimaal 5 zijn.
- Het aantal keren dat het motief werd herhaald moest minimaal 3 keer zijn.

Op basis van deze analyses zijn 10 kandidaat VNTR sequenties geselecteerd. De motieven (de sequentie van het zich repeterende stukje DNA) samen met hoe vaak het stukje wordt gerepeteerd staat voor deze 10 VNTR's weergegeven in Tabel 3.2. Tabel 3.3 toont de primers die flankerend aan de VNTR zijn ontwikkeld om de VNTR ook daadwerkelijk met PCR te kunnen detecteren en identificeren.

Tabel 3.2. Overzicht van de 10 VNTR's met motief, aantal nucleotiden in een repeat en het aantal repeats hiervan in het genoom van *D. dadantii* isolaat 3937

VNTR	Motief tandem repeat	Aantal nt	Aantal repeats
VNTR1	TGTTGTCACCATAA	14	3
VNTR2	ACGGTTACCCTATACAT	17	3
VNTR3	TGTCCTTAGAAACACC	16	3
VNTR4	GTTCATTG	8	5
VNTR5	ATGGGC	6	5
VNTR6	CTACTACTT	9	5
VNTR7	TCGGTTTGAGAACAAAG	16	5
VNTR8	AGGGGAACGGAGAGATG	17	3
VNTR9	ATGAATAAATAACAGC	17	3
VNTR10	GTAACACATTAGTC	14	3

Tabel 3.3. VNTR primer sets voor het karakteriseren van *Dickeya*, ontworpen op basis van de genomische sequentie van *D. dadantii* isolaat 3937

forward primer	sequentie	Reverse primer	sequentie	product grootte
EchR1F	ACG AAC GTC ATA TTG GAA GC	EchR1R	CAG CTT CGT TGA TAT TAA TGA CAC T	478bp
EchR2F	GCA AGG TGG TTT TTA TCT CTG ACC	EchR2R	CTC TGG AAA GAA AAC CAT CAG ATT A	381bp
EchR3F	GCA GAA AGG ACA ATG TTC AT	EchR3R	TAT ATG GGG TTC AGC CGT AT	505bp
EchR4F	CGG ATT TGT TCG TTT GAG TG	EchR4R	TGG TGG AAA GCA GTC AGA AC	586bp
EchR5F	CTC ATC ATC ACA TGT AAC GC	EchR5R	GAT GGA TTA TCC ATG GGG AG	470bp
EchR6F	AAG CAG ATA CCA AAC AGC GA	EchR6R	ACA GCC GTG TGT TTA CCC AC	431bp
EchR7F	GGC GGT GAT GCG GTT CTT GGA GTA	EchR7R	CTC TTC TGG CTT GCG CAA CG	462bp
EchR8F	ACA GCC CTA ATC TGA CCG GG	EchR8R	ATC AGT CTG GCG TGG GTA TCG AGC	455bp
EchR9F	TGG GGT GCC TCG CCG CCA AAC CGG	EchR9R	CAT GTG GAC TTC GAA TGG CA	464bp
EchR10F	ATT CGC TCA ACC TGC AAA GTT CGC C	EchR10R	GCG AGG ATG GGT TTG CAC TC	472bp

De PCR 's voor de verschillende VNTR's werd uitgevoerd onder de condities zoals vermeld in Tabel 3.5.

Tabel 3.5. De condities van de PCR voor de tien VNTR-analyses

Conditie	Aantal cycli
5 minuten 94 °C	1x
30 seconden 94 °C	40x
30 seconden 55 °C	
45 seconden 72 °C	
7 minuten 72 °C	1x

3.2.2 Resultaten en bruikbaarheid van VNTR voor onderscheid van isolaten van de diverse *Dickeya* soorten

In eerste instantie is onderzocht in hoeverre de primers ontworpen op *D. dadantii* isolaat 3937 voor de 10 ontwikkelde VNTR's een product vormden na PCR met een *D. solani* isolaat uit aardappel (9104), *D. dianthicola* isolaat uit Dahlia (9063), een *D. dadantii* isolaat uit hyacint (9128) en een *Dickeya chrysanthemi* isolaat uit Chrysanthemum morifolium (LMG2804). Tabel 3.6 toont hiervan de resultaten.

Tabel 3.6. Amplicons, aanwezig (+) of afwezig (-) na PCR.

Primer set	9104/aardappel	9128/Hyacint	LMG2804/Chrysanthemum	9063/Dahlia
VNTR1	-	+	-	-
VNTR2	+	-	-	-
VNTR3	+	+	-	-
VNTR4	-	+	-	-
VNTR5	+	+	-	-
VNTR6	+	+	-	-
VNTR7	+	+	+	-
VNTR8	+	+	-	-
VNTR9	+	+	+	-
VNTR10	+	+	-	-

Het aardappel *D. solani* isolaat 9104 gaf met uitzondering van VNTR2 en VNTR4 een amplicon. Ook isolaat 9128 (*D. dadantii*, hyacint) gaf met de meeste primer sets, behalve voor VNTR2, een amplicon; *E. chrysanthemi* isolaat LMG2804 gaf alleen een product met VNTR7 en VNTR9. *D. dianthicola* isolaat 9063 gaf geen enkel amplicon (Tabel 3.8). De VNTR's lijken op basis van deze eerste screening minder geschikt om te gebruiken voor *D. chrysanthemi* en *D. dianthicola*, omdat er nauwelijks een PCR product werd gevormd. Voor *D. solani* en *D. dadantii* wordt voor de meeste VNTR's een product gevormd. De vraag is of deze VNTR's binnen een soort (op isolaat niveau) ook onderscheidend zijn. Om dit te onderzoeken is het aantal isolaten per soort vergroot en opnieuw getest met de verschillende VNTR's. Tabel 3.7 geeft een overzicht van de isolaten die voor deze tweede screening zijn gebruikt.

Tabel 3.7 overzicht van *Dickeya* soorten/isolaten getest voor de verschillende VNTR's

Isolaten	Waardplant	<i>Dickeya</i> spp.
9104(PPO)/PRI2187	Aardappel	<i>D. solani</i>
2019 (PRI)	Aardappel	<i>D. solani</i>
2093 (PRI)	Aardappel	<i>D. solani</i>
2094(PRI)	Aardappel	<i>D. solani</i>
2187(PRI)	Aardappel	<i>D. solani</i>
2225(PRI)	Aardappel	<i>D. solani</i>
2235(PRI)	Aardappel	<i>D. solani</i>
2276(PRI)	Aardappel	<i>D. solani</i>
2277 (PRI)	Aardappel	<i>D. solani</i>
9002 (PPO)	Hyacint	<i>D. solani</i>
9006 (PPO)	Hyacint	<i>D. solani</i>
9019 (PPO)	Muscari	<i>D. solani</i>
9174(PPO)	Hyacint	<i>D. solani</i>
9010(PPO)	Freesia	<i>D. dadantii</i>
9127(PPO)	Freesia	<i>D. dadantii</i>
9128 (PPO)	Hyacint	<i>D. dadantii</i>
9018 (PPO)	Ixia	<i>D. dadantii</i>
9171(PPO)	Ixia	<i>D. dadantii</i>
9099(PPO)	Narcis	<i>D. dadantii</i>
9024 (PD552)	Scindapus	<i>D. dadantii</i>
9152(PD 471)	Philadenderon	<i>D. dadantii</i>
9151 (PD 1713)	Euphorbia	<i>D. dadantii</i>
9156 (PD753)	Eryngium	<i>D. dadantii</i>
9062 (PPO)	Dahlia	<i>D. dianthicola</i>
9064(PPO)	Dahlia	<i>D. dianthicola</i>
9065(PPO)	Dahlia	<i>D. dianthicola</i>
32(PPO)	Dahlia	<i>D. dianthicola</i>
33(PPO)	Dahlia	<i>D. dianthicola</i>
980(PD)	Aardappel	<i>D. dianthicola</i>
1478(PD)	Aardappel	<i>D. dianthicola</i>
2116(PD)	Aardappel	<i>D. dianthicola</i>
484(PD)	Aardappel	<i>D. dianthicola</i>
846(PD)	Aardappel	<i>D. dianthicola</i>
593(PD)	Kalanchoe	<i>D. dianthicola</i>
2804(PD/)	Chrysanthemum morifolium	<i>D. chrysanthemi</i>

VNTR 1, 2 en 4 bleken met de in Tabel 3.7 geteste isolaten van *D. solani* geen product te geven. De overige VNTR's gaven wel een product. Er werden echter bij *D. solani* geen verschillen in grootte voor specifieke VNTR's tussen de isolaten gevonden. Voor de geteste *D. dianthicola* en *D. dadantii* isolaten werden polymorfismen gevonden met VNTR 7 en 9.

3.2.3 Conclusie

- Voor *D. dianthicola* en *D. dadantii* zijn met de ontwikkelde VNTR's 7 en 9 polymorfismen gevonden.

- Dit biedt mogelijk perspectief voor karakterisatie op isolaatniveau voor deze twee soorten.
- Bij *D. solani* werden geen polymorfismen gevonden. Er dienen hiervoor andere primers te worden ontwikkeld.

3.3 Ontwikkeling van VNTR merkers voor karakterisatie van *Pectobacterium* soorten tot op isolaatniveau

3.3.1 Ontwerpen van VNTR's voor analyse van *Pectobacterium carotovorum* isolaten

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (*Pcc*) vormt een diverse groep met virulente en niet-virulente stammen. Analooq met de ontwikkeling van VNTR's voor *Dickeya* soorten zijn ook voor deze zeer diverse *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* groep kandidaat VNTR's ontwikkeld. Hiervoor is als referentie *Pcc* isolaat PC1 NC-012917 (Accession nr. CP001657) gebruikt. Het zoeken naar specifieke stukjes repeterend DNA vond plaats met het programma tandem repeat finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). Hiervoor zijn dezelfde selectie criteria gebruikt als voor de ontwikkeling van VNTR's voor *Dickeya* spp (zie paragraaf 3.3.1). Voor de kandidaat VNTR fragmenten zijn in de flankerde regio's een forward en een reverse primer ontwikkeld met de software Primer 3.

Op basis van de analyses zijn 10 kandidaat VNTR sequenties geselecteerd. De motieven samen met hoe vaak het stukje wordt gerepeteerd staat voor deze 10 VNTR's weergegeven in Tabel 3.8.

Tabel 3.8. Overzicht van de 10 VNTR's met motief, aantal nucleotiden in een repeat en het aantal repeats hiervan in het genoom van PC1 NC-012917

VNTR	Motief tandem repeat	Aantal nucleotiden	Aantal repeats
VNTR1	GGTCTACG	8	30
VNTR2	TTTAATCC	8	15
VNTR3	CTTCTTA	7	13
VNTR4	AAGGTTGA	8	9
VNTR5	ATAAAAACC	9	4
VNTR6	GTTTTACTGAAATTAATA	18	3
VNTR7	AAAAACATGGG	11	3
VNTR8	TTTTATTTGTCA	12	3
VNTR9	AGTAGAAGTAGAGTAG	16	3
VNTR10	GTAAATACTAC	12	3

3.3.2 Resultaten en bruikbaarheid van VNTR analyses voor *Pectobacterium carotovorum* isolaten

In eerste instantie is onderzocht in hoeverre de primers ontworpen op PC1 NC-012917 voor de 10 ontwikkelde VNTR's een PCR product vormden. De 10 primersets voor de tien VNTR's zijn getest op *Pcc*-isolaten uit aardappel, hyacint, iris en Zantedeschia. Voor elk gewas zijn twee isolaten getest.

Op basis van deze pre-screening bleven vier VNTR's over (VNTR's 3, 5, 6 en 8) die vervolgens zijn gebruikt voor het screenen van een groter aantal isolaten. Hiervan kwam er 1 uit *Ornithogalum*, 10 uit aardappel, 5 uit *Zantedeschia*, 1 uit iris, 4 uit hyacint, en 4 *Pcc* isolaten hadden onbekende herkomst. Bij 1 van deze isolaten met onbekende herkomst bleek het uiteindelijk niet om *Pcc* te gaan maar om *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*. De resultaten van deze VNTR analyse staan in Tabel 3.9

Tabel 3.9. Resultaten VNTR analyse per *Pcc* isolaat. Getallen geven het aantal basenparen weer.

Laan	<i>Pcc</i> Isolaat	Gewas	VNTR 3	VNTR 5	VNTR 6	VNTR 8
1	9042	U	P 217	NP	NP	NP
2	9047	Z	P 280	NP	NP	NP
3	9049	U	P 219	NP	NP	P 505
4	9054	I	P 296	P 200	P 269	P 222
5	9076	Z	P 360	P 196	P 289	P 242
6	9084	Or	P 280	P 198	P 285	P 242
7	9093	H	P 240	NP	NP	NP
8	9094	H	P 219	NP	NP	P 756
9	9095	H	P 222	NP	NP	P 221
10	9109	U	P 219	NP	NP	P 505
11	9116	A	P 423	P 484	P 278	P 447
12	9117	A	P 404	NP	P 275	P 422
13	9118	A	P 407	P 407	P 278	P 438
14	9119	A	P 443	P 407	P 275	P 422
15	9120	A	P 437	P 428	P 275	P 422
16	9121	A	P 418	P 379	P 275	P 417
17	9122	A	P 431	P 418	P 185	P 209
18	9123	A	P 222	P 218	P 463	P 491
19	9124	A	NP	P 220	NP	P 527
20	9125	A	P 222	P 338	P 455	P 497
21	9126	Z	P 318	P 263	P 258	P 231
22	9180	Z	P 238	NP	P 279	P 229
23	9181	Z	P 232	NP	P 275	P 231
24	9182	H	NP	NP	P 1179	P 447

(Waarin: A = aardappel, H = hyacint, I = iris, U = onbekend, Z = *Zantedeschia*, Or = *Ornithogalum sandersonii*, W = witlof; P = Product en NP = No product.

Figuur 3.2 toont de resultaten van de PCR met de VNTR3 primerset. De laan nummers uit de eerste kolom in Tabel 3.9 komen overeen met de nummers in Figuur 3.

Fig.3.2. Bandjes na PCR voor VNTR-3.



Uit Tabel 3.9 en figuur 3.2 blijkt, dat er polymorfismen bestaan tussen verschillende isolaten, maar kunnen ook dezelfde bandgrootte opleveren.

3.3.3 Conclusie

- *Pcc* isolaten uit verschillende gewassen kunnen dezelfde bandgrootte opleveren met dezelfde VNTR.
- Om onderscheid te maken tussen isolaten is het dan ook noodzakelijk dat de uitkomsten van meerdere VNTR's met elkaar worden gecombineerd.

4 Gevoeligheid van bolgewassen voor *Dickeya* soorten en *Pectobacterium*-isolaten

4.1 Inleiding

De vroegere veroorzaker van agressief snot in hyacinten, de bacterie *Erwinia chrysanthemi*, is recent omgedoopt tot het genus *Dickeya*. Binnen het genus *Dickeya* worden zes soorten onderscheiden. De belangrijkste veroorzakers van ziek in bloembollen en knollen binnen het genus zijn *Dickeya solani*, *D. dadantii* en *D. dianthicola*. Over de afgelopen jaren is bij PPO een collectie aan isolaten opgebouwd van *Dickeya* spp. geïsoleerd uit verschillende bolgewassen. De indruk is dat het waardplantbereik van de verschillende *Dickeya* soorten uit bolgewassen gedifferentieerd is. Dit experiment had ten doel om een alternatieve inoculum techniek te onderzoeken voor toepassing voor het besmetten van bollen (vacuummethode). Daarnaast is van een aantal *Erwinia*-isolaten een aantal mogelijke waardplanten getest middels een aanprikproef. De geteste waardplanten waren hyacint, Muscari, iris, Dahlia, Zantedeschia en narcis.

In voortgezet diagnostisch onderzoek is vacuüm ook getest als methode om latente besmettingen gevoeliger aan te kunnen tonen.

4.2 Infectie van bollen: vacuuminfiltratiemethode

Voor infectie-experimenten met bollen, met name die van hyacint, is een effectieve methode nodig om deze met *Erwinia* te kunnen besmetten. Bollen kunnen worden geïnoculeerd waarbij bacteriën in de bolbodem worden geïnjecteerd. Hoewel in veel gevallen dit een redelijke tot goede infectie van de bol opleverde, resulteerde dit wel een verwonding van de bol waarbij eventuele andere ziekteveroorzakende organismen zoals *Pseudomonas* kunnen binnendringen. Daarom is vacuuminfiltratie onderzocht als een alternatieve en nietdestructieve methode om *Erwinia* in de bol te krijgen.

4.2.1 Materiaal en methode

De isolaten Ech 2804 (LMG; *Dickeya chrysanthemi*) and Pcc2408 (LMG, *Pectobacterium carotovorum*) werden gekweekt gedurende 24 uur bij 27°C in steriele erlenmeyer flessen. De OD₆₀₀ van de cultuur werd op 0.01 gesteld met steriele 1x PBS buffer resulterend in concentraties van 1x 10⁶ cfu/ml voor *Pcc* and 5x10⁶ cfu/ml voor *Dickeya*.

Gezonde hyacintenbollen van cv Splendid Cornelia die negatief getest waren voor zowel *Dickeya* als *Pcc* werden geselecteerd en per 10 in in netzakjes gestopt. Voor vacuuminfiltratie werden de netjes ondergedompeld in een de bacteriesuspensie gedurende 5 minuten. De netjes werden daarna direct in de exicator gedaan en de druk ingesteld op 0.6 bar (Fig. 4.1). De incubatietijd bedroeg 15 of 30 minuten; als controles werden bollen geïnjecteerd dan wel in steriele PBS ondergedompeld. Na de behandeling werden de bollen gedurende 3-4 uur gedroogd aan de lucht, overgebracht in afgesloten containers en bewaard bij 30°C. Na 10 resp. 14 dagen werden de behandelingen beoordeeld door het aantal geïnfecteerde bollen te tellen.



Fig. 4.1. Vacuuminfiltratie van hyacintenbollen in een exicator.

4.2.2 Resultaten

De resultaten van de tellingen na exicatie staan weergegeven in Tabel 4.1. Tabel 4.1 toont de uitslag van de tellingen voor de verschillende behandelingen.

Tabel 4.1. Behandelingen van bollen voor de vacuummethode

Nr.	Behandeling	Na 10 dagen: % geïnfecteerde bollen	Na 14 dagen: % geïnfecteerde bollen
1	Negatieve controle (buffer)	0	0
2	<i>Pcc</i> 15 min. vacuum	0	20
3	<i>Pcc</i> 30 min. vacuum	50	70
4	<i>Pcc</i> aangeprikt	0	20
5	<i>Dickeya</i> 15 min. vacuum	0	0
6	<i>Dickeya</i> 30 min vacuum	0	60
7	<i>Dickeya</i> aangeprikt	60	100

Uit Tabel 4.1 blijkt, dat hyacintenbollen door toepassing van vacuuminfiltratie geïnoculeerd kunnen worden met *Pcc* en *Dickeya*. De symptomen zijn het leeglopen en zacht worden van de bollen (Fig.4.2).

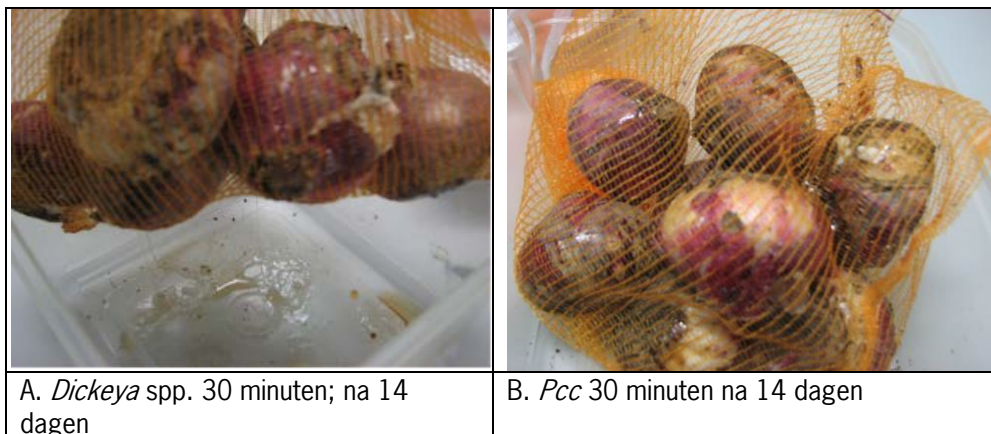


Fig 4.2. Bolsymptomen na inoculatie en vacuüm van hyacintenbollen

Langere incubatietijd bij 0.6 bar geeft hogere infectiepercentages.

4.2.3 Conclusie

- De vacuümmethode kan worden gebruikt om bollen ziek te maken.
- Voor het aanbrengen van een latente infectie in bollen en gebruik van deze bollen voor het onderzoek is verdere optimalisatie van de methode nodig.

4.3 Waardplantbereik van *Pectobacterium* en *Dickeya* bepaald via aanprikken *in vitro* en in bollen

4.3.1 Materiaal en methode

In twee afzonderlijke experimenten is bepaald in hoeverre verschillende *Dickeya* spp en *Pectobacterium* spp. in staat zijn bol/knol materiaal van narcis (cv. Minow), Dahlia (cv. Karmen Lagoon), hyacint (cv. Delft Blue), Iris (cv. Blue Magic) en aardappel (cv. Anabel) ziek te maken na kunstmatige beschadiging van de bollen/knollen. De experimenten werden uitgevoerd in een *in bolla* assay en een *in vitro* plaat assay. Voor de *in vitro* test werden bollen uitwendig gesteriliseerd en vervolgens in plakken gesneden. De schijven werden in petrischalen gelegd en vervolgens geoculeerd met de verschillende isolaten. Bij de *in bolla* toets bleven de bollen intact en werden deze direct aangeprikt en geoculeerd met de verschillende isolaten.

Tabel 4.2. Isolaten en gewassen uitgetest in de *in bolla test*.

Herkomst	Isolaat	Soort	gewas						
			Narcis Minow	Aardappel Anabel	Dahlia Karmen Lagoon	Iris Blue Magic	Muscari americanum	Muscari alba	Hyacint Delft Blue
Hyacint	9134	<i>D.solani</i>	x	x	x	x	x	x	x
Aardappel	9162	<i>D.solani</i>	x	x	x	x	x	x	x
Dahlia	9064	<i>D. dianthicola</i>	x	x	x	x	x	x	x
Sedum	9226	<i>D. dianthicola</i>	x	x	x	x	x	x	x
Hyacint	9128	<i>D.dadantii</i>	x	x	x	x	x	x	x
Narcis	9231	<i>D.dadantii</i>	x	x	x	x	x	x	x
Brodiae	Brod	<i>D.dadantii</i>	x	x	x	x	nvt	nvt	x
Aardappel	9124	<i>Pcc</i>	x	x	x	x	x	x	x
Hyacint	9094	<i>Pcc</i>	x	x	x	x	x	x	x
Zantedeschia	0018	<i>P. marginalis</i>	x	x	x	x	nvt	nvt	x
Zantedeschia	0012	<i>P. syringae morsprunorum</i>		nvt	nvt	nvt	x	x	x

X = getest in prikproef; nvt = niet getest

De isolaten werden eerst op petrischalen (NA-medium) en vervolgens in vloeibaar medium gekweekt (CM001, Oxoid). De eindconcentraties aan bacteriën in het inoculum was $4-7 \cdot 10^7$ cfu/ml. Bollen en knollen (niet ontsmet) werden aangeprikt en geïnoculeerd met de bacteriesuspensie. Bollen werden vervolgens voor 2 weken weggezet in een geperforeerde leliezak bij 28 °C en daarna beoordeeld. Per gewas werden drie bollen/knollen aangeprikt. Uitzondering was de besmetting van Muscari deze werd met 6 bollen uitgevoerd.

Tabel 4.3. Isolaten en gewassen uitgetest in de *in vitro* bolschijf test

Herkomst	Isolaat	Soort	gewas			
			Aardappel Anabel	Dahlia Karmen Lagoon	Zantedeschia Mercedes	Hyacint Delft Blue
Hyacint	9134	<i>D.solani</i>	x	x	x	x
Aardappel	9162	<i>D.solani</i>	x	x	x	x
Dahlia	9064	<i>D. dianthicola</i>	x	x	nvt	x
Sedum	9226	<i>D. dianthicola</i>	x	x	nvt	x
Hyacint	9128	<i>D.dadantii</i>	x	x	x	x
Narcis	9231	<i>D.dadantii</i>	x	x	x	x
Brodiae	Brod	<i>D.dadantii</i>	x	x	nvt	x
Aardappel	9124	<i>Pcc</i>	x	x	x	x
Hyacint	9094	<i>Pcc</i>	x	x	x	x
Zantedeschia	0018	<i>P. marginalis</i>	x	x	nvt	x

X = getest in prikproef; nvt = niet getest

Voor de *in vitro* test werden de bollen en knollen uitwendig ontsmet. Dahlia en Zantedeschia werden hiertoe gespoeld met kraanwater en vervolgens 10 minuten ontsmet in 1 % chloor. Aardappelen en hyacinten werden gewassen met water en zeep en vervolgens ontsmet met 70 % ethanol en aan de lucht gedroogd.

Isolaten werden overnacht gegroeid bij 27 °C zonder schudden. De concentratie bacterie in het inoculum was 10⁵ cfu/ml.

4.3.2 Resultaten

Tabel 4.4 geeft het aantal rotte bollen/knollen dat van de 3 (of 6 bij Muscari) bollen/knollen zacht werd. De beoordeling vond plaats 2 weken na inoculatie voor de bollen geïnoculeerd met *Dickeya* spp. en na 3 weken voor *Pectobacterium* spp..

Tabel 4.4. Aantallen snotbollen in de aanprikproeven (*in bolla*) voor de verschillende gewassen en isolaten.

Herkomst	Isolaat	Soort	gewas						
			Narcis Minow	Aardappel Anabel	Dahlia Karmen Lagoon	Iris Blue Magic	Muscari americanum *	Muscari alba *	Hyacint Delft Blue
Negatieve buffer controle			0	0	0	0	0	0	0
Hyacint	9134	<i>D.solani</i>	0	0	1	3	5	2	3
Aardappel	9162	<i>D.solani</i>	1	0	1	1	0	0	3
Dahlia	9064	<i>D. dianthicola</i>	0	0	0	0	0	0	1
Sedum	9226	<i>D. dianthicola</i>	0	2	1	0	0	0	0
Hyacint	9128	<i>D.dadantii</i>	3	0	1	3	2	0	3
Narcis	9231	<i>D.dadantii</i>	3	0	0	3	4	2	3
Brodiaea	Brod	<i>D.dadantii</i>	3	1	1	3	nvt	nvt	3
Aardappel	9124	<i>Pcc</i>	0	0	0	0	0	0	1 **
Hyacint	9094	<i>Pcc</i>	0	0	0	0	0	0	1
Zantedeschia	0018	<i>Pseudomonas marginalis</i>	0	0	0	0	nvt	nvt	3
Zantedeschia	0012	<i>Pseudomonas syringae morsprunorum</i>	nvt	nvt	nvt	nvt	0	0	nvt

nvt = niet getest; * = aantal snot bollen uit 6; ** =verdacht

Een aantal opvallende observaties uit Tabel 4.4 na aanprikken van de bol/knol:

- Geen enkel isolaat van *D. solani* leidde in deze assay tot rotte aardappelknollen. Ook niet isolaat 9162 dat oorspronkelijk geïsoleerd is uit aardappelen. Daarentegen leidde infectie met *D. dianthicola* uit Sedum tot 2 rotte aardappels. Ook in het geval van *D. dadantii* werd 1 zieke knol waargenomen met het isolaat uit Brodiaea. De aantasting door *D. dianthicola* werd door Real-time PCR bevestigd. Voor de knol geïnfecteerd met het Brodiaea isolaat is geen PCR toets uitgevoerd.
- Rotte bollen/knollen zijn voor *D. solani* wel gevonden voor iris (zeker), Muscari (zeker), hyacint (zeker) en Dahlia.
- Rotte bollen/knollen zijn voor *D. dianthicola* gevonden voor aardappel, Dahlia, en hyacint.
- Rotte bollen/knollen zijn voor *D. dadantii* gevonden voor narcis (zeker), aardappel, Dahlia, iris (zeker), Muscari (zeker) en hyacint (zeker).
- Bij hyacint is aantasting gevonden van *Pcc* en *Pseudomonas marginalis*

- Iris en hyacint zijn waard voor *D. solani* en *D. dadantii*. Hyacint is mogelijk ook een (slechte) waard voor *D. dianthicola*. Er werd 1 zieke bol gevonden na infectie met isolaat 9064 uit Dahlia.
- Narcis is waard voor *D. dadantii*. Met *D. solani* is 1 zieke bol gevonden. Narcis is geen waard voor *D. dianthicola*.
- Muscari is waard voor *D. solani* en *D. dadanti*. Dit zijn dezelfde *Dickeya* spp., die ook hyacint aantasten. *D. dianthicola* tast Muscari niet aan.
- Dahlia kan door alle drie geteste *Dickeya* soorten worden aangetast.. Echter in deze toets blijft het bij een enkele knol. Ondanks, dat de partij knollen vooraf op een latente infectie van *Dickeya* spp. werd getest met klassieke PCR na voorkweek en de uitslag negatief was, blijft enig voorbehoud nodig door het geringe aantal knollen dat kon worden getest in deze assay. De toets zal dus herhaald moeten worden met groter aantallen knollen in de assay en de controle.
- De proefopzet is nog niet geheel optimaal. Dit blijkt o.a. uit het resultaat met aardappel en het *D. solani* isolaat 9162 uit aardappel, waarmee geen rotte aardappel werd gevonden.

Tabel 4.5 toont de resultaten van de *in vitro* assay uitgevoerd voor Dahlia, Zantedeschia, hyacint en aardappel.

Tabel 4.5. Isolaten en gewassen uitgetest in de *in vitro* bolschijf test (aantal schijfjes= 3)

Herkomst	Isolaat	Soort	gewas			
			Aardappel Anabel	Dahlia Karmen Lagoon	Zantedeschia Mercedes	Hyacint Delft Blue
Negatieve buffer controle			0	0	2	0
Hyacint	9134	<i>D.solani</i>	2	3	3	3
Aardappel	9162	<i>D.solani</i>	1	3	3	3
Dahlia	9064	<i>D. dianthicola</i>	0	3	nvt	3
Sedum	9226	<i>D. dianthicola</i>	0	3	nvt	3
Hyacint	9128	<i>D.dadantii</i>	0	3	3	3
Narcis	9231	<i>D.dadantii</i>	0	3	3	3
Brodiae	Brod	<i>D.dadantii</i>	1	3	nvt	3
Aardappel	9124	<i>Pcc</i>	0	3	3	2
Hyacint	9094	<i>Pcc</i>	0	3	2	3
Zantedeschia	0018	<i>Pseudomonas marginalis</i>	2	2*	nvt	3

nvt = niet getest; * gaatje in weefsel/schijfje niet zacht.

Een aantal opvallende observaties uit Tabel 4.5 na oculatie van schijfjes bol/knol:

- Zantedeschia is in de plaatassay altijd positief inclusief de negatieve controle. Zacht worden van het weefsel heeft dus een andere oorzaak, mogelijk heeft dit te maken met de leeftijd van de knollen, danwel een latente infectie met *Pcc*.
- Dahlia is in deze test positief voor alle isolaten inclusief *Pcc*. Dit is een duidelijk verschil met de *in bolla* assay. Enerzijds bestaat de mogelijkheid dat Dahlia vooral reageert op de pectolytische activiteit van de bacteriën. Argumenten hierin zouden kunnen zijn dat tot dusver alleen *D. dianthicola* is aangetroffen in praktijkmonsters binnengekomen via de PPO diagnostiekservice. Daarnaast wijkt het resultaat sterk af van de data uit de *in bolla* test. Hoewel ook hier voor alle soorten één enkele rotte bol is gevonden. Daarbij is de partij vooraf negatief getoetst voor *Dickeya* sp. Herhalen van de proef is noodzakelijk met grotere aantallen tenen om hier een eenduidig antwoord in te kunnen geven.
- Hyacint is hier vatbaar voor alle isolaten. Vooral het resultaat met *D. dianthicola* is hierin opmerkelijk en staat in contrast met het *in bolla* experiment.
- Aardappel reageert in deze test wel overeenkomstig de verwachtingen. Rot met *D. solani* en met *D. dianthicola*. Echter ook hier slechts 1 of 2 schijfjes.

4.3.3 Conclusie en discussie

- De *in vitro* toets gaf bij de getoetste gewassen Dahlia, Zantedeschia en hyacint zoveel aantasting bij alle getoetste *Erwinia*'s dat deze toetswijze niet als betrouwbaar wordt gezien. Het aantal getoetste bollen/knollen was klein, zodat enig voorbehoud bij de conclusies noodzakelijk is en het onderzoek op grotere schaal zou moeten worden herhaald.

Op basis van de *in bolla* toets (aan prikken van van bol/knol) blijkt dat:

- Narcis waard is voor *D. dadantii*, mogelijk waard is voor *D. solani* en geen waard voor *D. dianthicola*
- Hyacint, muscari en iris waard zijn voor *D. solani* en *D. dadantii*. Mogelijk dat hyacint ook een waard is voor *D. dianthicola*.
- Dahlia mogelijk een waard is voor *D. solani*, *D. dadanthi* en *D. dianthicola*
- Voor de aardappel de aanpriktoets niet het verwachte resultaat opleverde (Geen rot met het aardappelisolaat).

De *in vitro* toets voldoet niet in deze vorm omdat:

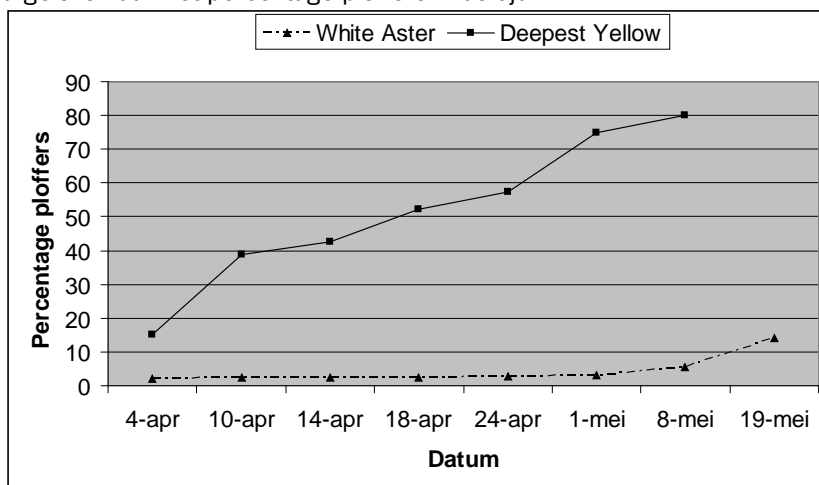
Volgens de *in vitro* toets zouden hyacint, Zantedeschia en dahlia vatbaar zijn voor alle isolaten. Vooral het resultaat voor Dahlia en Zantedeschia is opmerkelijk. Het zacht worden van de schijven heeft hierbij mogelijk alleen te maken met de pectolytische activiteit van de deze bacteriën, zonder dat zij in hele bollen in staat zijn de bol ook echt ziek te maken. De uitkomst lijkt sterk beïnvloed door de gebruikte assay. De waarde van deze assays zal dan ook kritisch moeten worden bekeken en is mogelijk, alleen voor specifieke gewassen in te zetten.

5 Resistentie (tolerantie) bij Dahlia- en Zantedeschia cultivars

5.1 Inleiding

In het project Beheersing van *Erwinia* dat in 2008 is afgesloten is gebleken dat in een infectieproef (aanprikken, zie hoofdstuk 4) met twee cultivars Dahlia (Fig. 5.1) er een duidelijk verschil in gevoeligheid voor *Dickeya dianthicola* werd waargenomen. Dit was aanleiding om in het vervolgonderzoek Deltaplan *Erwinia* het aspect van mogelijke resistentie (beter is te spreken van tolerantie) bij Dahlia te onderzoeken. Met Zantedeschia cultivars is variatie in gevoeligheid voor *Pcc* (*Pectobacterium carotovorum* subsp., *carotovorum*, het oude *Erwinia carotovora carotovora*) geconstateerd (Van Leeuwen et al. 2009). Zantedeschia wordt alleen maar door *Pcc* geïnfecteerd en niet door *Dickeya* subsp. tot zover bekend (Snijder et al. 2002). Deze waarneming is binnen dit projectonderdeel van deltaplan *Erwinia* eveneens nader onderzocht. Verder is het beter te spreken van tolerantie of meer of minder gevoelig voor *Pcc* dan te spreken over resistentie. Tot nu toe is er geen absolute ongevoeligheid (resistentie) bij Zantedeschia waargenomen.

Fig. 5.1. Aanprikproef met 2 Dahlia cv's (2006) met *D. dianthicola* waarbij de mate van aantasting is afgelezen aan het percentage ploffers in de tijd.



5.2 Tolerantie bij Dahlia

5.2.1 Materiaal en methode infectie knollen 2009

In 2009 zijn knollen van Dahlia geïnjecteerd met *E. chrysanthemi* (*D. dianthicola*) (OD = 0,1) met een hoeveelheid van 1 ml/knol. Er zijn per cultivar 100 knollen ingezet (Tabel 5.1).

Knollen van een aantal cultivars zijn opgelegd en na het verhogen van de temperatuur ingespoten met *Dickeya dianthicola* (deze kan als enige tot zo ver bekend van de *Dickeya*-soorten Dahlia infecteren).

De proef is uitgevoerd met 50 knollen/bak en 2 herhalingen.

Behandelingen:

1. Controle (geen behandeling)
2. Inspuiten met *Dickeya dianthicola*

Proef werd uitgevoerd met 8 cultivars: 4 waarvan men denkt dat deze gevoeliger zijn, 4 waarvan men vermoedt dat deze minder gevoelig zijn (Tabel 5.1). Opgelegd 2e en 3e week van januari 2009.

Kastemperatuur vanaf januari t/m 2 maart: 13-15 °C. Vanaf 2 maart 2009: 21 °C. Verder onder code uitgevoerd (Tabel 5.2).

Tabel 5.1. Gebruikte Dahlia cv's (met verwachte gevoeligheid) voor resistentie experimenten (injectie met *Dickeya dianthicola*).

Cultivar	Verwachte gevoeligheid
A	Niet
B	Wel
C	Niet
D	Wel
E	Niet
F	Wel
G	Niet
H	Wel

5.2.2 Resultaten infectie knollen

Tabel 5.2. Percentage ploffers in experiment 2009

cultivar	% ploffers in controle	% ploffers in besmette knollen	Toename (%)
A	1	18	17
B	2	16	14
C	2	28	26
D*	25	64	39
E	0	18	18
F*	21	66	45
G*	56	73	17
H	0	62	62

Sommige cultivars (Tabel 5.2: D, F, G) bleken veel gevoeliger voor *Dickeya* dan andere cultivars. Twee opvallende zaken: ten eerste cultivar G was aangemerkt als minder gevoelig maar liet veel uitval zien. Daarnaast is opvallend het % *Dickeya* in ogenschijnlijk gezonde knollen.

Deze knollen bleken latent besmet te zijn. Daarom is besloten om in vervolg onderzoek met stekken uit weefselkweek te werken waarbij de kans op besmet materiaal zeer gering is.

5.2.3 Infectie stekken 2010

In 2010 zijn resistentieproeven in Dahlia uitgevoerd met een aantal nieuwe cultivars. Stekken van acht Dahlia-cultivars zijn via injectie met bacteriecellen besmet met *Dickeya dianthicola* (isolaat uit Dahlia) of *D. solani* (isolaat uit hyacint). De stekken van zeven cultivars waren afkomstig van moerplanten van weefselkweek, één cultivar (de species *D. coccinea*) van reguliere stekken.

Op het veld bleken de Dahlia-cultivars wel gevoelig te zijn voor *D. dianthicola* (Fig.5.2; 5.3) maar niet voor *D. solani*. Dit komt overeen met de ervaring dat in Dahlia uitsluitend *D. dianthicola* wordt aangetroffen. Het percentage uitval na besmetting met *D. dianthicola* varieerde tussen de verschillende cultivars van minimaal 9 en 18% tot maximaal 50, 54 en 56% (Tabel 5.4). Er lijken dus verschillen in gevoeligheid voor *D. dianthicola* te bestaan.



Fig. 5.2. Proefveld met Dahlia cv's, besmet met *D. dianthicola*. Uitvalplekken zijn duidelijk waarneembaar.



Fig. 5.3. Verwelkende Dahlia door *D. dianthicola*-besmetting

Tabel 5.3. Dahlia cv's gebruikt voor resistentie-onderzoek tegen *D. dianthicola/solani* (2010)

behandeling	besmetting	cultivar	stek	Aantal
1	Nee	Cultivar A	oud	34
2	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar A	oud	34
3	Ja, <i>D. solani</i>	Cultivar A	oud	34
4	Nee	Cultivar A	nieuw	4
5	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar A	nieuw	4
7	Nee	Cultivar B	oud	46
8	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar B	oud	46
10	Nee	Cultivar B	nieuw	16
11	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar B	nieuw	16
13	Nee	Cultivar C	oud	32
14	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar C	oud	32
15	Ja, <i>D. solani</i>	Cultivar C	oud	32
16	Nee	Cultivar C	nieuw	10
17	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar C	nieuw	10
19	Nee	Cultivar D	oud	37
20	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar D	oud	37
22	Nee	Cultivar D	nieuw	12
23	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar D	nieuw	12
25	Nee	Cultivar E	oud	34
26	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar E	oud	34
28	Nee	Cultivar E	nieuw	27
29	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar E	nieuw	27
31	Nee	Cultivar F	oud	48
32	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar F	oud	48
34	Nee	Cultivar F	nieuw	30
35	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar F	nieuw	30
37	Nee	Cultivar G	Oud	15
38	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar G	Oud	15
40	Nee	Dahlia coccinea	Oud	30
41	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Dahlia coccinea	Oud	30

Tabel 5.4 Percentage uitval tijdens de teelt.

	controle	<i>D. dianthicola</i>	<i>D. solani</i>
Cultivar A	0.0	8.8	0.0
Cultivar B	4.5	53.6	
Cultivar C	0.0	55.7	3.1
Cultivar D	0.0	17.9	
Cultivar E	7.4	36.9	
Cultivar F	3.4	35.2	
Cultivar G	6.7	26.7	
Dahlia coccinea	10.0	50.0	

Bij het toetsen (TaqMan PCR zie hoofdstuk 3) van geoogste knollen op aanwezige bacteriën bleken de controle knollen niet besmet te zijn met *Dickeya*. De visueel gezonde knollen geïnjecteerd met *D. dianthicola* bleken besmet te zijn met deze bacterie. De knollen geïnjecteerd met *D. solani* bleken besmet met deze bacterie. De visueel gezonde geoogste knollen bleken dus wel besmet te zijn met de bacteriën waarmee ze waren geïnfecteerd.

5.2.4 Infectie stekken 2011

In 2011 zijn zeven cultivars van Dahlia (uit weefselkweek dus waarschijnlijk bacterievrij) wel of niet besmet met *Dickeya dianthicola*. Hier zijn 375 stekken voor gebruikt. Daarnaast zijn stekken (66 stuks) van twee cultivars besmet met *D. solani*. De stekken zijn via injectie besmet met 200 µl suspensie met OD 0,1. Na de besmetting konden de stekken één week in de kas groeien waarna ze buiten op het veld (8 juni) zijn uitgeplant.

De gewasreactie op het veld was vergelijkbaar met die in 2010. De niet besmette stekken en stekken besmet met *D. solani* groeiden uit tot normale planten met minimale uitval. De stekken besmet met *D. dianthicola* lieten al vrij snel uitval zien en planten die achterbleven in groei en gingen slaphangen. *D. dianthicola* veroorzaakte meer uitval dan de controleplanten, maar er was daarbij geen verschil tussen de cultivars. *D. dianthicola* had gemiddeld wel lichtere knollen tot gevolg dan de controle behalve bij twee cultivars. Ten aanzien van de gevoeligheid voor *Dickeya* kan worden gesteld dat alle cultivars even gevoelig waren ten aanzien van uitval op het veld maar dat twee cultivars met besmetting gemiddeld zwaardere knollen produceerden dan de andere vijf besmette cultivars. Mogelijk is de omvang van de proef te klein geweest om betrouwbare verschillen tussen cultivars ten aanzien van uitval waar te nemen.

De knollen geoogst in 2011 zijn in 2012 eveneens getoetst op aanwezigheid van *Dickeya* middels TaqMan PCR. In tabel 5.6 is te zien dat in de knollen die met *D. dianthicola* zijn geïnjecteerd deze bacterie vaak aangetoond kon worden, en ook in één van de vijf knollen geïnjecteerd met *D. solani*. Ook een enkele controle knol bleek besmet met *D. dianthicola* zodat er vermoedelijk sprake is van herinfectie/besmetting tijdens de teelt. In de knollen geïnfecteerd met *D. solani* kon deze bacterie niet meer worden aangetoond.

Tabel 5.5. Dahlia infectieproeven voor resistentie-onderzoek tegen *D. dianthicola* (2011).

beh	besmetting	cultivar	Knollen toetsen in 2012	Aantal/herh	% verwelking
1	Nee	Cultivar A	5	12	0
2	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar A	5	12	30.3
3	Ja, <i>D. solani</i>	Cultivar A	5	12	0
4	Nee	Cultivar B		12	0
5	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar B	5	12	47.3
6	Nee	Cultivar C	5	12	0
7	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar C	5	12	52.3
8	Ja, <i>D. solani</i>	Cultivar C	5	12	0
9	Nee	Cultivar D		12	0
10	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar D	5	12	0
11	Nee	Cultivar E		12	0
12	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar E	5	12	52.7
13	Nee	Cultivar F		12	0
14	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar F	5	12	29.1
15	Nee	Cultivar G		12	0
16	Ja, <i>D. dianthicola</i>	Cultivar G	5	12	50.0

Tabel 5.6. Toetsing knollen op aanwezigheid geïnjecteerde bacteriën.

<i>Dianthicola</i>				<i>Solani</i>			
	ziek	gezond	verdacht		ziek	gezond	verdacht
1	1	3	1	1	0	5	0
2	3	2	0	2	0	5	0
3	1	1	3	3	0	5	0
5	4	1	0	5	0	4	1
6	2	2	1	6	0	5	0
7	5	0	0	7	0	5	0
8	1	4	0	8	0	5	0
10	0	5	0	10	0	5	0
12	5	0	0	12	0	5	0
14	4	1*	0	14	0	5	0
16	5	0	0	16	0	5	0
VM+PBS	nvt	nvt	1	VM+PBS	nvt	1	nvt
VM	nvt	0	nvt	VM	nvt	1	nvt

5.2.5 Conclusie

- Visueel gezonde knollen kunnen besmet zijn met *Dickeya dianthicola*.
- Stekken afkomstig van moederplanten waren vrij van *D. solani* en *D. dianthicola*.
- Er lijkt een verschil tussen Dahlia cultivars in hun gevoeligheid voor *D. dianthicola*, maar dit kon niet elk jaar worden aangetoond.
- Stekken geïnjecteerd met *D. dianthicola* lieten uitval tijdens de teelt zien via karakteristieke verwelkingsverschijnselen.
- Visueel gezonde knollen afkomstig van stekken geïnfecteerd met *D. dianthicola* bleken veelal besmet te zijn met deze bacterie.
- Stekken geïnjecteerd met *D. solani* lieten geen uitval of verwelkingsverschijnselen zien.
- Visueel gezonde knollen afkomstig van stekken geïnfecteerd met *D. solani* bleken het ene jaar wel en het andere jaar niet besmet met deze bacterie. Deze bacterie veroorzaakt geen ziekteverschijnselen in Dahlia en kan zich soms blijkaar ook moeilijk handhaven in de plant.

5.3 Resistentie (tolerantie) bij Zantedeschia

5.3.1 Inleiding

Zantedeschia is een belangrijk siergewas in Nederland waar grote aantallen van worden geproduceerd. Zantedeschia is gevoelig voor bacterieel zachtrot die voor uitval kan zorgen van knollen maar ook problemen kan veroorzaken bij de snijbloemen (slijmstelen; Van Leeuwen et al. 2009 en 2011). De meest voorkomende aantastingen worden veroorzaakt door *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*, voorheen *Erwinia carotovora carotovora*) en *Pseudomonas* subsp. zoals *Pseudomonas marginalis*. Deze slaan toe zowel in het veld of kas als in de bewaring. Detectie is lastig vanwege het voorkomen van latente (symptoomloze) infecties zodat deze bacteriën ongezien kunnen worden verspreid. Beheersing van deze zachtrot ziekten is dus moeilijk en vormt een gevaar voor de Zantedeschia-productie. Naast hygiëne en preventie door gevoelige detectiemethoden is de bevordering van cultivarresistentie een mogelijkheid tot oplossing van dit “rot”-probleem.

Het vaststellen van eventuele resistentieniveau's in bestaande cultivars is van belang voor kwekers en veredelaars. Hoewel we hier spreken van resistentie is, zoals eerder opgemerkt, het beter te spreken van mogelijk tolerantie.

Voor *Zantedeschia* zijn slechts een beperkt aantal studies uitgevoerd om resistentie-niveau's te bepalen (R.C. Snijder et al. 2002; T. Luzzatto 2007). De toepassing van een zg. ponsjes-test is eerder beschreven (zie hoofdstuk 3). Deze *in vitro* test op resistentie van *Zantedeschia* cv's: blad- en knolponsjesproeven zijn toegepast om een semi-kwantitatieve beoordeling van de mate van resistentie tussen *Zantedeschia*-cultivars te vergelijken.

5.3.2 Uitvoering en resultaten

Er zijn twee toetsen doorontwikkeld om de mate van weerstand van cultivars tegen *Pcc* vast te stellen: een aangepaste bladponsjes toets en een knolschijftoets. De eerste toets is gebaseerd op het meten van de afbraak van bladponsjes door enzymen van *Pcc*. Tolerante cv's zullen minder "aangevreten" bladponsjes vertonen dan de gevoelige cv's.

Daarnaast is een knoltoets ontwikkeld, gebaseerd op een vergelijkbare toets voor aardappel. Hierbij worden knolschijfjes van *Zantedeschia* T1-knollen besmet met *Pcc*. De kans dat deze knollen latent besmet zijn is erg klein. De mate van verslijming en verrotting, veroorzaakt door *Pcc* gedurende de incubatieperiode zegt iets over de gevoeligheid van de geteste cultivar. Door zowel het blad- als de knol van *Zantedeschia* te testen voor gevoeligheid voor *Pcc* wordt meer zekerheid over de algehele resistentie van de plant verkregen.

Er zijn 6 cultivars *Zantedeschia* gebruikt, die verder onder code zijn verwerkt: 1 t/m 6.

In 2010 is in *Zantedeschia* een test op gevoeligheid voor *Pectobacterium* (*Pcc*) met bladponsjes uitgevoerd (Fig. 5.5). Echter, de visueel gezonde bladeren van de geteste cultivars bleken al besmet te zijn met *Pcc*. De bladponsjestoets van *Zantedeschia* gaf verschillen in agressiviteit van en gevoeligheid voor *Pectobacterium*-isolaten weer; de twee geteste cultivars gaven significante verschillen aan in gevoeligheid voor vijf verschillende *Pcc*-isolaten. Cultivar Crystal Blush bleek minder gevoelig voor de geteste isolaten, afkomstig uit o.a. hyacint, aardappel en *Zantedeschia*.

In 2011 zijn zes *Zantedeschia* cultivars getoetst op hun gevoeligheid voor *Pectobacterium*. Daarvoor zijn één jaar oude knollen (T1-knollen, oogst 2010) uit weefselkweek gebruikt. Een aantal van deze knollen zijn in de kas in bakken geplant. De bladeren die daaruit groeiden zijn gebruikt voor een bladponsjesproef, de overige knollen zijn gebruikt voor een knolinfectie proef. Er waren verschillen tussen de cultivars (cv 1, 2 en 6 gevoeliger dan cv 3, 4 en 5) in de mate waarin de knollen of de bladponsjes werden aangetast door *Pectobacterium*. De resultaten van de bladponsjes en de knollen kwamen redelijk goed overeen. Bij de knoltoets bleken de cv 1 en 6 gevoeliger dan 2, 3, 4 en 5. Alleen cultivar 2 reageerde verschillend in beide toetsen.

Fig. 5.4. Gewichtsafname van Zantedeschia bladponsjes, zoals bepaald door wegen na incubatie met 2 *Pcc*-isolaten (blauw, rood)

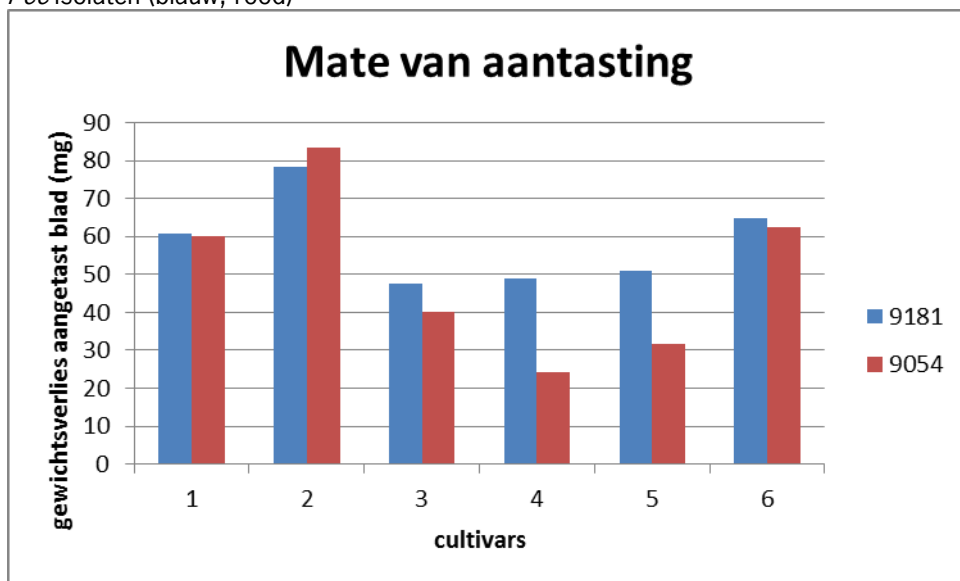


Fig.5.5. Zantedeschia bladponsjes experiment , na afspoelen onder stromend water en drogen

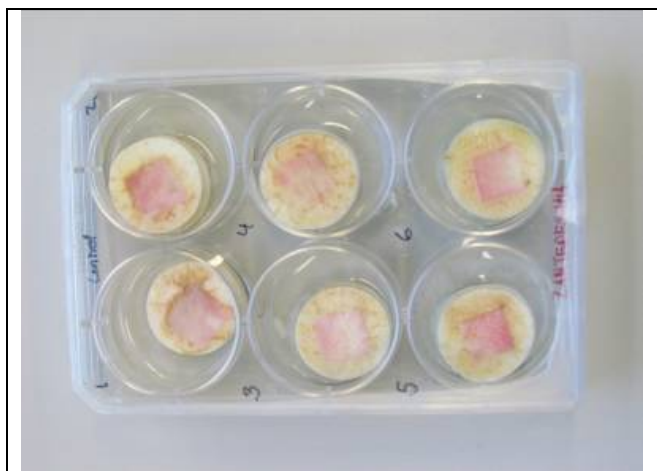
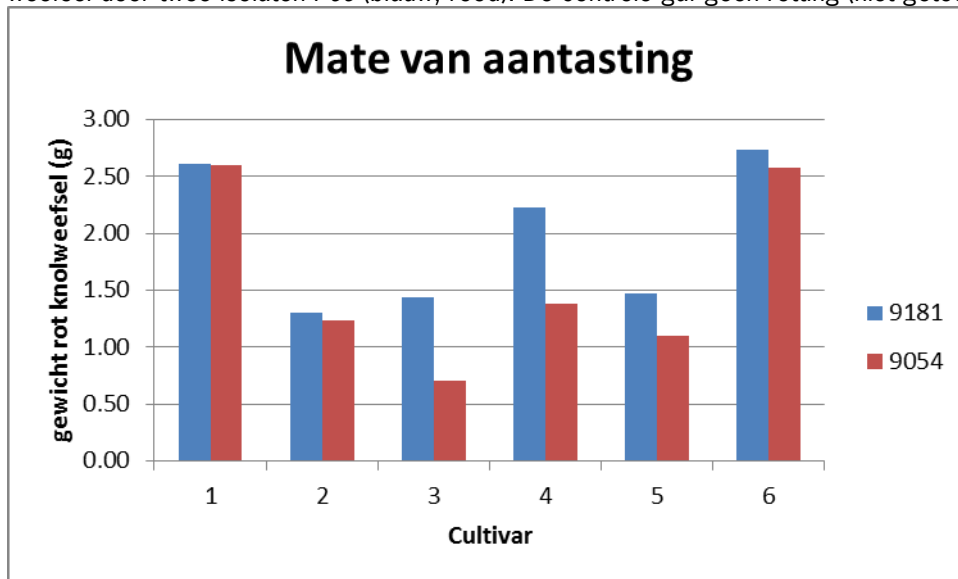


Fig.5.6. Voorbeeld van een knolschijfjesteets om de mate van pectolytische activiteit (rot) te bepalen

Fig.5.7. Gewichtsverlies door rotten van Zantedeschia knolschijfjes (zie fig.5.6) van 6 verschillende cultivars weefsel door twee isolaten *Pcc* (blauw, rood). De controle gaf geen rotting (niet getoond in de figuur)



5.3.3 Resultaten Zantedeschia 2012

Het onderzoek met het incuberen van bladponsjes en knolschijven met *Pcc* zoals uitgevoerd in 2011 is in 2012 met dezelfde zes cultivars herhaald. Daarnaast is een cultivar onderzocht die als duidelijk minder gevoelig bekend staat (cultivar 7).

De bladponsjes van de controle en geïncubeerd met *Pseudomonas* (St-12) bleven stevig terwijl de bladponsjes besmet met de twee stammen *Pcc* snel volkomen waterig werden. Er was daarbij geen verschil tussen de cultivars. Hoewel de proef identiek is uitgevoerd aan die van 2011 waren de resultaten sterk afwijkend.

Knolschijfjestest

In figuur 5.9 is te zien dat de cultivars 4 en 6 minder zwaar zijn aangetast dan de cultivars 2, 3 en 7 (isolaat 9054).

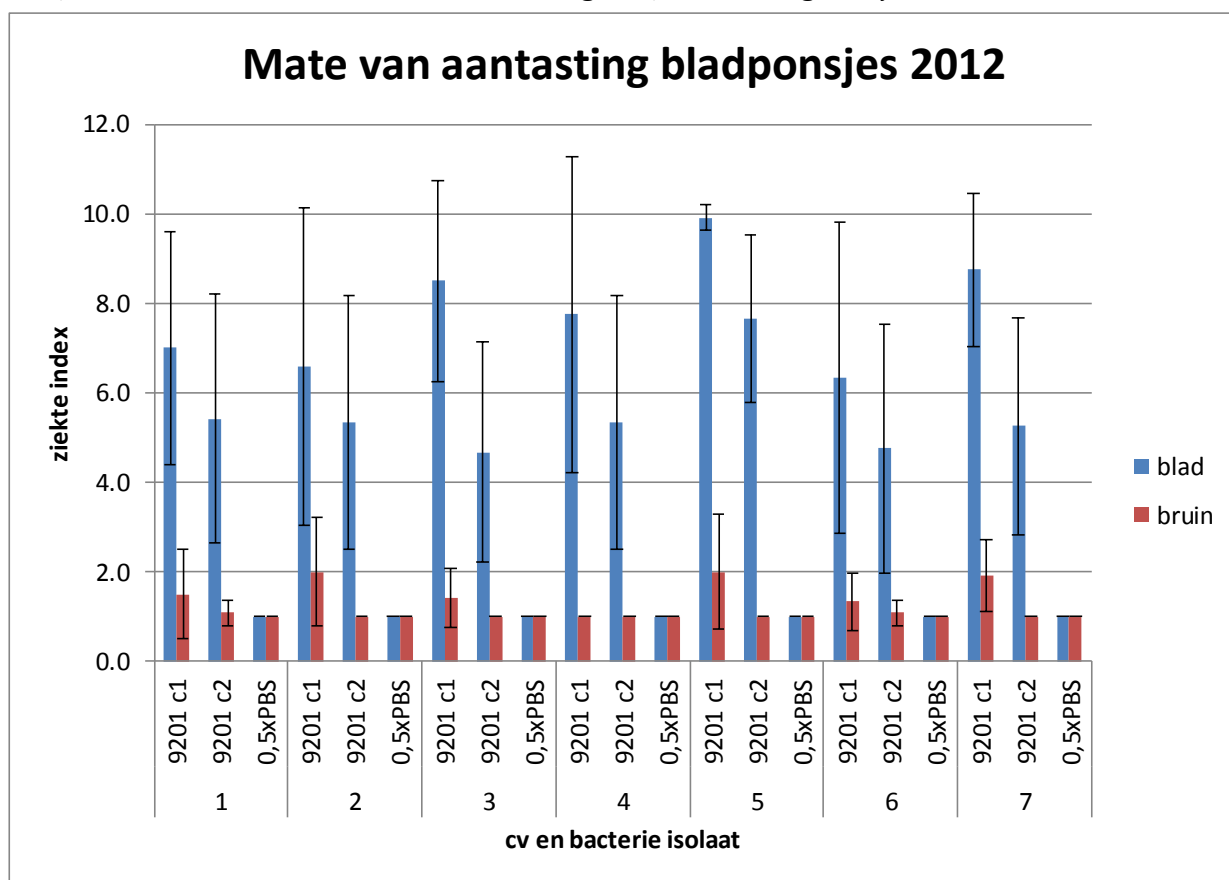
Opvallend is dat cultivar 7, die als minder gevoelig wordt bestempeld in de knoltoets zwaar werd aangetast. Cultivar 2 was latent besmet want ook met steriel water ging de knol rotten.

Ten opzicht van de toets van vorig jaar was ook nu cultivar 4 minder gevoelig

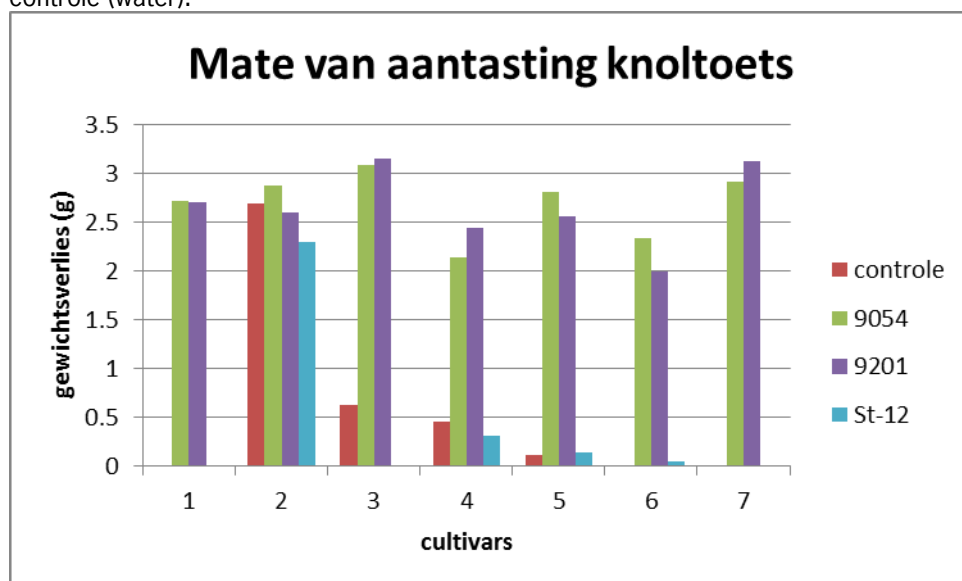
Op basis van visuele beoordeling lijkt er geen verschil tussen de cultivars bij beoordeling drie dagen na aanvang van de proef.

Opvallend is dat als een spruit op het stukje knol aanwezig was deze vaak goed bleef terwijl in de praktijk een spruitje snel omvalt bij een aantasting door *Pcc*. Na deze proef is het de vraag of de proef niet eerder had moeten worden beoordeeld om beter verschillen tussen cultivars waar te nemen of dat de gebruikte concentratie *Pcc* lager had moeten zijn.

Fig. 5.8. Incubatie van bladponsjes van 7 *Zantedeschia* cultivars met 3 bacterie-isolaten (*Pcc* 9201 en 9054, *Pseudomonas* st-12) en controle. 1= niet aangetast, 10 = volledig verslijmd



Figuur 5.9. Mate van aantasting van knol van 7 cultivars door twee isolaten van *Pcc*, *Pseudomonas* of controle (water).



5.3.4 Conclusie en discussie

- In het eerste jaar lieten een aantal cultivars zien minder gevoelig te zijn voor *Pcc* dan andere cultivars. In het tweede jaar bleken deze resultaten niet reproduceerbaar te zijn.
- Zowel de bladponsjes als de knoltoets laten (soms) verschillen tussen cultivars zien maar deze blijken niet reproduceerbaar.
- Het is onduidelijk of met het optimaliseren van de toetsen (standaard materiaal gebruiken, een nog lagere concentratie *Pcc*) deze wel reproduceerbaar wordt.

Voor deze resistentietoetsen is bewust gekozen voor T1 knollen om zo eventuele latente infecties met andere bacteriën tot een minimum te beperken die de aantasting door de experimenteel toegevoegde *Pcc* of *Pseudomonas* zou kunnen beïnvloeden.

Hoewel pseudomonaden bijdragen aan bacterierot in *Zantedeschia* en andere gewassen (Van Leeuwen et al. 2009) bevestigt de bladponsjestoets dat *Pcc* tot de agressieve rotveroorzakers behoort en veel hogere pectolytische activiteit vertoonde in de resistentietoetsen. Er kon geen verschil in gevoeligheid voor *Pseudomonas* in de 6 geteste cv's worden waargenomen.

De bladponsjestoets is gevoelig voor variatie, maar kan bij nauwkeurig gebruikt volgens vast protocol dat nog aangescherpt moet worden, tesamen met in in vivo toets en veldobservaties bij *Zantedeschia* cultivars een extra (kwantitatieve) middel zijn voor veredelaars om gevoeligheid/tolerantie van *Zantedeschia* cultivars in kaart te brengen. Op deze wijze kan resistentie in bestaande genitoren tegen *Pcc* gebruikt worden om op nieuwe, meer tolerante cultivars te veredelen.

6 Volgen van partijen bollen op aanwezigheid van *Erwinia*

6.1 Infectieroutes

De meest voorkomende besmetting met agressief snot bij hyacint vindt plaats bij de verwerking (rooien, schonen, sorteren, tellen en planten, waarbij beschadiging optreedt. Op het veld vindt mogelijk ook besmetting plaats. Daarvoor zijn bollen niet op grond maar op water gezet om te bewortelen en de infectie goed te kunnen volgen.

Bij infectieproeven met *Dickeya* in waterbroei met hyacint bleek dat hyacintenbollen alleen visueel ziek worden op het moment van doorbreken van de wortels. Er vonden geen zichtbare infecties vanuit het water plaats wanneer de bacteriën werden toegevoegd nadat de wortels doorgebroken waren. In de waterbroei bleek *Pcc* veel minder agressief te zijn dan *Dickeya*. Preventie van aanwezigheid van *Erwinia*'s voor en tijdens het doorbreken van de wortels zou dus infectie in waterbroei kunnen voorkomen. Dit is een verschil in vergelijking met de infectieroute bij aardappel. In aardappel kan *D. solani* via intacte wortels binnendringen en schade veroorzaken*. Interessant is te melden dat uit ander onderzoek is gebleken dat bacteriofagen deze aantasting door *Dickeya* kunnen remmen (deelonderzoek binnen het LNV-project "bacteriofagen").

Bij hyacint kan *D. solani* de plant binnendringen via beschadigingen aan het blad en via water in hyacintenkokers. In vergelijkbare experimenten met *Pcc* gebeurde dit niet, hetgeen opvallend was, omdat aantasting in de praktijk, bijvoorbeeld via het gewas op het veld, wel voorkomt. Bij hoge concentraties bacteriën kan dit gepaard gaan met "watersoaked lesions": waterige infectieplekken. Dit werd in alle experimenten vastgesteld bij *D. solani*, maar was niet waarneembaar voor *Pcc*. Een andere belangrijke infectieroute in hyacint lijkt "kokerwater" te zijn (water in de bladschedes). Indien bacteriën van *D. solani* in kokerwater worden aangebracht, kan dit leiden tot het wegvallen van planten. Hieruit kan geconcludeerd worden dat *D. solani* ook in dit infectiemodel (veel) agressiever is dan *Pcc*.

6.2 Infectieroute van *Erwinia*: via de wortel?

Bij aardappel is vastgesteld via fluorescent gelabelde *D. solani* dat de wortels invalspoort kunnen zijn voor deze bacterie en zo de plant kunnen koloniseren en aantasten (Czajkowski et al. 2010). Het doel van dit projectonderdeel was, om te bepalen of *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* spp.) hyacinten door de wortel kan binnendringen en zo de bol besmet.

Dit moet inzicht verschaffen of *Erwinia* wel of niet (actief) via wortels de bol van hyacinten kan binnendringen en grond besmet met *Erwinia* daarmee een potentiële infectiebron is. Mogelijkerwijs kan *Dickeya* spp. alleen via de bolbodem binnendringen op moment van doorbreken van de wortels.

6.2.1 Materiaal en methode.

De bacterie-isolaten die gebruikt zijn in deze studie zijn *de D. solani*-isolaten PPO 9134 uit *Hyacinthus orientalis*, PD2222 uit *Solanum tuberosum* en *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolaat LMG2408 (Jones 1901) uit *Zantedeschia aethiopica*. De hyacintenbollen waren van de cultivar Delft Blue. Negen stuks voorgeprepareerde hyacintenbollen werden op 1 februari 2010 in 3 herhalingen op honingraten gezet in plastic bakken gevuld met water. Hierbij kwam de bolbodem net onder water te staan. Dit water werd drie keer verversed na respectievelijk 7, 14 en 23 dagen. Op vier verschillende tijdstippen, namelijk op de dag van het opzetten van de hyacintenbollen en 2, 7 en 28 dagen na het opzetten van de hyacintenbollen werd een suspensie bacteriën toegevoegd. De exacte concentraties bacteriën in de bakken, direct na inoculatie, staan weergegeven in Tabel 6.1. Aan negatieve controle bakken werd 1x PBS zonder bacteriën toegevoegd.

Tabel 6.1. Concentratie bacteriën direct na inoculatie zoals toegevoegd op 0, 2, 7 en 28 dagen na opzetten van de hyacintenbollen.

Bacterie	Concentratie bacteriën (cfu/ml)			
	t=0	t=2	t=7	t=28
<i>D. solani</i> PPO9134	$8 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
<i>D. solani</i> PD2222	$4 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^7$
<i>P. carotovorum</i> LMG2408	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$

De bakken met hyacinten werden weggezet bij 17 °C in een klimaatcel zonder daglicht. Voor de laatste inoculatie op 1 maart 2010, 28 dagen nadat de bollen waren opgezet, is het waterniveau verlaagd tot onder de bolbodem, waardoor alleen nog de wortels in het water stonden. De bollen zijn dezelfde dag verplaatst naar de kas bij een temperatuur van 23 °C.

6.2.2 Resultaten

Tijdens de waterbroei werden de bollen visueel gevolgd in de tijd. De eerste witte wortelpuntjes, die door de bolbodem braken, waren zichtbaar één dag na het opzetten. Na 2 dagen waren deze uitgegroeid tot ongeveer een halve cm. Figuur 6.1 toont de wortelontwikkeling in de eerste 14 dagen na het opzetten van de hyacintenbollen.



Figuur 6.1. Overzicht van de wortelontwikkeling 0, 2 en 14 dagen na het opzetten van de bollen.

De wortelgroei verliep traag en was erg wisselend binnen en tussen bakken.

De eerste snotbollen waren zichtbaar 14 dagen na inoculatie in de bakken van isolaat PPO9134 en PD2222 geïnoculeerd op t=0 en t=2 (Figuur 2, afb.1). Voor isolaat PPO9134 resulteerde dit uiteindelijk in 7 snotbollen voor tijdstip t=0 en 6 snotbollen voor tijdstip t=2. Voor PD2222 waren dit 3 snotbollen voor t=0. Geen effect op de plantontwikkeling was zichtbaar voor de de inoculaties uitgevoerd met de verschillende bacterie stammen, 7 en 28 dagen na het doorbreken van de wortels.

Geen van de 27 bollen in de bakken op t=0 geïnoculeerd met PPO9134 en PD2222 ontwikkelden een spruit. Wortels reduceerde zich tot stompjes of verslijmde. Snotbollen werden gedurende de loop van de proef niet gezien in bakken van de negatieve controle en bakken geïnoculeerd met *P. carotovorum* LMG2408.



1



2



3



4

Figuur 6.2. Visuele observaties van de waterbroei. 1) snotbol in een bak geïnoculeerd met PPO9134 op $t=0$, 14 dagen na inoculatie; 2) Foto in de kas 39 dagen na opzetten van de bollen geïnoculeerd op $t=0$. Met van voor naar achter 3 bakken met PD2222, LMG2804 en buffer Bollen die weg zijn waren aangetast 3) en 4) Planten van inoculatie op $t=2$ (Afb. 3) en $t=7$ (Afb. 4) 52 dagen na opzetten met van links naar rechts het effect van: PPO9134, PD2222, LMG2408, PBS.

Naast uitval door *Dickeya* kwamen ook in de controle bakken een aantal bollen niet tot bloei of spruitvorming, zoals te zien is in afb. 2 van fig. 6.2. Mogelijk heeft dit te maken met een *Fusarium* aantasting die binnen de partij aanwezig was. Reeds bij aanvang van de proef wortelden de bollen hierdoor slecht.

6.2.3 Conclusie en discussie

- Deze studie toont aan, dat *Dickeya solani* de bol binnen kan dringen op het moment, dat de wortels door de bolbodem heen breken.
- Er zijn tijdens deze studie geen aanwijzingen gevonden, dat de bacterie dit ook kan op het moment dat de wortel reeds is gevormd.
- Wanneer de besmetting wordt aangebracht, nadat de wortels in het geheel zijn doorgebroken leidt dit niet tot snotbollen en ontwikkelt het gewas zich normaal.

In aardappel zijn experimenten gedaan met *D. solani* waaruit blijkt dat *D. solani* ook actief de wortel binnen zou kunnen gaan (Czajkowski et al. 2010). Om ook met enige zekerheid te kunnen stellen, dat dit ook voor *D. solani* geldt, zijn gevoeliger technieken nodig, zoals PCR of zouden de bollen van deze planten langer gevolgd moeten worden. Opplant van bollen om een mogelijke latente infectie in het volgende jaar vast te kunnen stellen is met bollen uit de waterbroei echter niet mogelijk.

Opmerkelijk is, dat ondanks dat *P. carotovorum* beter gedijt bij temperaturen rond de 20 °C dan *D. solani* er voor *P. carotovorum* na inoculatie geen snotbollen werden gezien.

D. solani uit hyacint lijkt zich binnen deze proef agressiever te gedragen dan het isolaat uit aardappel. Er werden meer snotbollen gezien en ook over een langere periode tijdens het doorbreken van de wortels. Een nadere studie naar het verschil in pathogeniteit tussen isolaten zou hier meer licht op kunnen werpen.

6.3 Veldsymptomen van *Dickeya* spp.

6.3.1 Inleiding

De veldsymptomen van het “witsnot” *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) zijn in het hyacintenvak wel bekend; het wegzakken of glazig worden van planten met de typische versnotting en rotsymptomen (Fig.6.4).



Fig.6.4 Door *Pcc* aangetaste hyacint

Gezien de grote problemen met het “agressieve snot”, veroorzaakt door vooral *Dickeya dadantii* en *solani* is in een klein veldexperiment een met *Dickeya solani* besmette partij gevolgd en beoordeeld op symptomen. Tevens zijn symptomen bemonsterd en geanalyseerd op de aanwezigheid van bacterien. Ten slotte zijn insecten gevangen en getest op de aanwezigheid van met name *Dickeya* via PCR-analyse van totaal DNA van deze vliegen. Dit om mogelijkerwijs een indicatie te krijgen of insecten *Erwinia*'s te velde kunnen verspreiden.

6.3.2 Materiaal en Methode

Veldjes Blue Jacket met 25% latent aanwezige *Dickeya* (gebaseerd op bolmonsters van deze partij, zijn gevolgd op symptomen. Op 24 mei 2012 zijn wegvallende planten geconstateerd. Op 29 mei 2012 zijn foto's genomen (Fig. 6.5 en 6.6) en een aantal monsters genomen. Een selectie van 8 planten met symptomen is gemaakt, waarvan een aantal hiervan gesplitst is in een bol- en een bladmonster. Deze zijn met een PCR getoetst op *Pcc* en *Dickeya*.

Insecten zijn gevangen met behulp van lijmplaten in het veld tussen zieke hyacinten.



Fig.6.5. Veldsymptomen, waargenomen in een partij Blue Jacket met 25% *Dickeya* latent aanwezige besmetting.





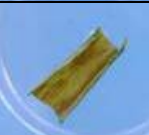




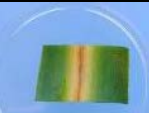

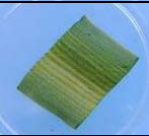
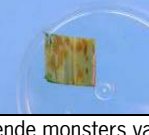
Fig. 6.6. Blue Jacket planten, verdacht van *Dickeya*-symptomen

Van symptomatisch weefsel van de hyacinten cultivar Blue Jacket is een stukje genomen en 1:5 gelyseerd met PN1 lysisbuffer volgens protocol (zie hoofdstuk 3). Bladeren hiervoor werden geoogst op 29/5.

6.3.3 Resultaten

De symptomen die op 29/5 op het veld zichtbaar waren in het blad van Blue Jacket zijn uitgearpareerd en getoetst in PCR (Fig.6.7).

Fig.6.7. Gearpareerde symptomen uit blad van Blue Jacket met toetsuitslag

Herkomst	Monster*	Visueel	Test uitslag
1 gezond	A groen blad		<i>Negatief voor Pcc en Dickeya.</i>
	B wit deel onderin blad		<i>Positief voor Dickeya spp.</i>
2 plant met vlekken op blad	A		<i>Negatief voor Pcc en Dickeya.</i>
3 plant met mogelijke symptomen in blad	A		<i>Negatief voor Pcc en Dickeya.</i>
	B		<i>Negatief voor Pcc en Dickeya.</i>
4 plant met witsnotsymptomen in blad			<i>Positief voor Pcc</i>
5 gelige plant met snot in bol en waterdoorschoten blad			<i>Positief voor Pcc</i>
6 gelige plant zonder snot in bol	A		<i>Negatief voor Pcc en Dickeya.</i>
	B		<i>Negatief voor Pcc en Dickeya.</i>
7 plant met geel wordend blad			<i>Negatief voor Pcc en Dickeya.</i>
8 plant met vlekken op blad			<i>Negatief voor Pcc en Dickeya.</i>

*bij de toevoeging A of B gaat het om verschillende monsters van dezelfde plant

Symptomen bij monster 2 en 8 lijken vergelijkbaar: roestbruine vlekken op het blad. Hierin is geen *Erwinia* vastgesteld met PCR noch via uitplaten. Hetzelfde geldt voor de geel verkleuring in blad uit monsters 3, 6 en 7. In de waterdoorschoten gedeelten in het blad van monsters 4 en 5 werd *Pcc* aangetoond en in monster 1B (op het oog gezonde plant en bol) *Dickeya*. Een infectie met *Pcc* of *Dickeya* spp. toont zich dus in het blad met waterdoorschoten verkleuringen. Visueel was er geen verschil tussen de *Pcc* en *Dickeya* aantastingen waar te nemen.

In de gevangen insecten (vele soorten) is geen *Erwinia* aangetoond.

6.3.4 Conclusie en discussie

- Op het veld wijzen waterdoorschoten en versnottende bladeren op een besmetting met *Erwinia*'s.
- Bij roestbruine vlekkerigheid in bladeren, maar ook bij vergelende bladeren werden geen *Erwinia*'s aangetoond.
- In het witte gedeelte van een blad met een licht bruin/gele streep werd *Dickeya* aangetoond.

Op het veld zijn bovengondse symptomen anders dan waterdoorschoten en versnottende bladeren nog niet bekend voor agressief snot en witsnot. In de praktijk wordt in het veld vooral witsnot gezien, waarbij planten maar ook hele plekken kunnen ontstaan met wegsnottende planten.

6.4 Volgen van partijen hyacinten op *Erwinia*-besmetting

6.4.1 Inleiding

Gebleken is dat er veel overeenkomst is tussen de uitslag van de NAK-toets op *Dickeya* en de ervaring van de telers/kopers (i.s.m. HOBAGO, CNB) met de betreffende getoetste partij in het vervolg van de teelt of in het teeltjaar erna. Dit is uitgebreid onderzocht binnen het PT project "Ontwikkeling van praktijktoetsen voorzuur, snot en bolrot" PT 13373.

Dit project beoogde vooral een praktijk stresstoets te ontwikkelen en op bedrijven in te voeren met als referentie de DNA-toets (Bioplex) van de NAK. Om vast te stellen op partijen die besmet zijn, en specifiek partijen hyacinten die als schoon getoetst waren verder te vervolgen is geen aandacht besteed. Dit aspect is voor hyacint binnen het Deltaplan C uitgevoerd. Het is van het grootste belang te weten of schone partijen daadwerkelijk schoon (kunnen) blijven. Daarom is dit onderdeel tijdens het project 'Snelle praktijktoetsen' uitgevoerd.

6.4.2 Uitvoering en resultaten

Vijf partijen zijn in 2009 en opnieuw in 2010 getoetst op het voorkomen van agressief snot. Er werd getoetst aan bolbodem en neus na homogeniseren en voorkweek volgens standaard PPO protocol. Twee hyacintenpartijen die in 2009 vrij waren, bleken ook in 2010 vrij. Één partij was beide jaren zwaar besmet; één partij was in 2009 voor 1% besmet en in 2010 vrij en een andere partij was vrij in 2009 en voor 1% besmet met *Dickeya* in 2010 (zie Tabel 6.3).

Tabel 6.3. Volgen van partijen hyacinten op aanwezigheid van *Dickeya* spp.

Partij hyacinten	Ervaring in 2009	Praktijkttoets/PCR	Toetsing door de NAK in 2009	Ervaring in 2010	Toetsing door de NAK in 2010
1	besmet	16%	100%	besmet	4 %
8	vrij	1 % *	0 %	vrij	0 %
3	vrij	2 % *	0 %	vrij	0 %
9	vrij	0 %	0 %	vrij	1 %
40	twijfel	0 %	1 %	vrij	0 %

* geen *Dickeya* maar *Pectobacterium*

Deze resultaten (Tabel 6.3) dragen bij aan de hypothese, dat een gezonde partij (geen symptomen en geen latent aanwezige *Erwinia*) *Erwinia*-vrij kan blijven, terwijl een (licht-) besmette partij hyacinten vroeg of laat symptomen van agressief snot zal gaan vertonen.

Gedurende de loop van dit onderzoek zijn altijd bollen van bedrijven aangekocht voor het onderzoek. Veel verschillende partijen zijn ook gebruikt voor het vergelijken van de thuistoets met de NAK-toets. Daarbij zijn vaak bollen van verschillende bedrijven enkele jaren achtereen gebruikt. Daaruit bleek ook dat sommige bedrijven bollen hadden die (vrijwel) geen aantasting hadden en bedrijven die in een of meerdere partijen/cultivars jaarlijks een aantasting hadden. Dit bevestigde het vermoeden dat een besmetting vaak partij gebonden is en gedurende jaren in de partij aanwezig blijft en geeft aan dat het schoon starten van groot belang is.

In 2011 zijn er een aantal gesprekken gevoerd op hyacintenbedrijven, waar een besmetting met *Erwinia* (onverwacht) optrad, om de mogelijke oorzaak te achterhalen. Duidelijk is dat dit achteraf vaak zeer moeilijk na te gaan is:

- Informatie over omstandigheden ontbreekt;
- Eventuele latente besmetting kan aanwezig zijn geweest, maar is niet vastgesteld;
- Aantasting door *Erwinia* maar in een deel van de partij; informatie voorgeschiedenis ontbreekt;
- Het blijkt lastig te zijn voor de praktijk om partijen/jaargangen goed gescheiden te houden;
- Is de *Erwinia*-aantasting nu agressief snot of witsnot?;
- Toetsen met thuistoets en/of NAK toets zou meer duidelijkheid kunnen geven;
- In geval van toetsing: soms blijkt een partij toch besmet in tegenstelling tot de verwachting van de teler. Andersom blijkt ook dat er wel wat aantasting gevonden wordt, maar dat dit niet in de toets gevonden aangetoond wordt. Dit heeft veelal te maken met het relatief kleine monster en de grote partijen waarbij vaak elke leeglopende bol wordt gezien (zeker als ze in gaasbakken worden bewaard). Meestal is ook niet bekend welke *Erwinia* verantwoordelijk is voor de aantasting.

6.4.3 Conclusie en discussie

- Er zijn voldoende aanwijzingen dat aangenomen mag worden dat het schoon starten met gezonde werkbollen en goed gescheiden houden van partijen en jaargangen in de doorteelt kan leiden tot het gezond houden van partijen.

Er zouden meer partijen getoetst moeten worden en gedurende enkele jaren gevolgd en ook getoetst moeten worden om betrouwbaarder data te verkrijgen dat er gezonde partijen zijn en dat deze gezond kunnen blijven gedurende enkele jaren.

6.5 Volgen van partijen *Dahlia* op aanwezigheid van *Erwinia*

6.5.1 Inleiding

Net als voor hyacint en *Zantedeschia* is het belangrijk te weten voor *Dahlia* in hoeverre gezonde partijen schoon en vrij van *Erwinia*'s (met name *D. dianthicola*) blijven. Hiertoe zijn gedurende 3 jaar waarnemingen gedaan aan twee partijen *Dahlia* afkomstig uit weefselweek. Deze partijen zijn gedurende 3 jaren een aantal maal bemonsterd om vast te stellen of er een besmetting was ontstaan.

6.5.2 Uitvoering en resultaten

Het onderzoek in *Dahlia* is in 2009 gestart met weefselweekmateriaal van twee cultivars. Per datum zijn steeds 50 stekken of planten getoetst. Van de 50 planten zijn 10 mengmonsters gemaakt met 5 planten per monster. Soms is het monster in één geheel getoetst (bijvoorbeeld stekken of knollen), soms is het monster in onderdelen getoetst. Voor *Dahlia* zijn soms de onderdelen: blad, kraag en knol apart getoetst. De monsters zijn vooraf uitwendig ontsmet met chloorbleekloog zodat alleen een inwendige besmetting aangetoond zou worden. De bemonsteringsdata zijn weergegeven in tabel 6.4.

Het was in eerste instantie de bedoeling om weefselweek materiaal gedurende drie jaren te volgen onder praktijkomstandigheden. Echter, beide ondernemers hebben het materiaal na twee jaren vervangen. In het derde jaar is materiaal getoetst dat voor het tweede jaar werd geteeld (dus al één jaar uit weefselweek was), een soort herhaling van het tweede jaar met een versere partij.

In april 2009 zijn van de cultivar GW de weefselweekplantjes uit het nog steriele kuipje met agar getoetst. De weefselweekplanten van KL waren al uitgeplant in een multitray voordat ze zijn getoetst. De planten stond niet meer in een steriele omgeving. In beide monsters is geen *Dickeya* of *Pectobacterium* aangetoond. Dit onderzoek is met schoon materiaal gestart. Ook vóór het maaien in juli (een mogelijk besmettingsmoment) waren de planten vrij van *Dickeya*. Vlak voor het rooien (okt. 2009) is via DNA-toetsen een lichte besmetting aangetoond in beide cultivars (ongeveer 2%). In oktober 2009 zijn bij deze monsters het blad, de kraag en de knollen apart getoetst. In GW is in één mengmonster *Dickeya* aangetoond (minimaal 2% besmet), alleen in het blad. In KL is ook in één mengmonster *Dickeya* aangetoond (minimaal 2% besmet), maar in zowel het blad als de kraag en de knollen. Een aantal planten is ook getoetst zonder de uitwendige ontsmetting maar daarin werd bij beide cultivars geen *Dickeya* of *Pectobacterium* aangetoond.

Tabel 6.4. Data van de bemonsteringen aan 2 cv's *Dahlia* (KL en GW).

Gewas	Datum bemonstering	Opmerkingen over monster
Dahlia	april 2009	Weefselweekmateriaal
	juli 2009	Monster vóór het maaien
	oktober 2009	Monster vóór het rooien
	december 2009	Monster na het rooien
	maart 2010	Eerste stekken (geplukt of gesneden)
	april 2010	Late stekken
	juni 2010	Monster vóór het maaien
	september 2010	Monsters van sap tijdens het maaien
	oktober 2010	Monster voor het rooien
	Maart 2011	Eerste stekken (geplukt of gesneden)
	April 2011	Late stekken
	Juni 2011	Monster vóór het maaien
	Oktober 2011	Monster voor het rooien

In december 2009 zijn de geoogste knollen getoetst op kraag en knollen en vooraf uitwendig ontsmet. Bij KL waren 4 mengmonsters positief voor *Dickeya* (minimaal 8% besmet), waarbij bij drie monsters in de kraag en knol en bij één monster alleen in de kraag. Bij cv GW waren 5 mengmonsters positief voor *Dickeya* (minimaal 10% besmet) waarvan bij drie alleen in de kraag. Opvallend is dat alle mengmonsters KL positief waren voor *Pectobacterium* en bij GW één. Er kan geconcludeerd worden dat in 2009 het uitgangsmateriaal vrij van *Dickeya* en *Pectobacterium* was. Voor het maaïen is geen *Dickeya* aangetoond, maar wel direct voor en na het rooien. Voor het rooien is in één monster alleen *Dickeya* aangetoond in het blad en niet in de knol. Ook na het rooien is in een aantal monsters de bacterie wel in de kraag maar niet in de knol aangetoond. Hierdoor ontstaat het vermoeden dat de besmetting mogelijk (ook) via het maaïen plaatsvindt. Ten overvloede moet worden opgemerkt dat het hier gaat om *Dickeya dianthicola*.



Fig.6.8. Ploffers bij Dahlia-knollen

Van GW zijn in maart 2010 de eerste, gesneden stekken getoetst, terwijl van KL de eerste geplukte stekken zijn getoetst. In de stekken van beide cultivars is geen *Dickeya* aangetoond. In één mengmonster van KL is *Pectobacterium* (minimaal 2% besmet) aangetoond.

In april 2010, het laatste deel van de stekperiode, zijn nogmaals stekken geplukt. In KL is in twee monsters (minimaal 4% besmet) en in GW in één monster (minimaal 2% besmet) *Dickeya* aangetroffen. Slechts in één monster van KL is *Pectobacterium* (minimaal 2% besmet) aangetoond.

In juni 2010 is alleen het blad met steel bemonsterd. Bij KL is geen *Dickeya* aangetoond, bij GW in 4 mengmonsters (minimaal 8% besmet). In september 2010 zijn monster genomen van sap van een lintzaag waarmee een standaard partij is gemaaid en waarmee een weefselkweekpartij is gemaaid. Daarnaast is sap getoetst van een heggenschaar waarmee bij PPO Dahlia's zijn gemaaid die wel of niet zijn besmet met *Dickeya*.

In het sap van de lintzaag waarmee weefselkweekpartijen werden gemaaid is geen *Dickeya* aangetoond maar in het sap afkomstig van de standaardpartijen is wel *Dickeya* aangetoond.

Zo ook bij de heggenschaar: *Dickeya* werd wel aangetoond in sap van besmette planten maar niet in het sap van de onbesmette controle planten.

Voor het rooien in oktober 2010 is zowel het blad als de knol bemonsterd. In GW is geen *Dickeya* aangetoond en in KL in 2 monsters (minimaal 4% besmet) in de kraag, maar niet in de knol. Voor 2010 kan geconcludeerd worden, dat in de eerste stekken na het opstoken van de kas geen *Dickeya* aangetoond is, in de latere stekken wel. Heeft *Dickeya* tijd en warmte nodig om zich te vermeerderen en te verplaatsen van de knol/vaatbundels naar de stekken? In juni is een minimale besmetting aangetoond waarbij er vooral besmetting werd gevonden in de partij GW en niet in KL terwijl tot op dat moment in GW minder aantasting werd aangetroffen dan in KL. Mogelijk is de monsternamen niet groot genoeg om harde uitspraken te doen over percentages aantasting.

Dickeya is duidelijk aangetoond in het sap van de lintzaag en heggenschaar. Daarmee lijkt het maaïen een zeer waarschijnlijke route voor verspreiding van de bacterie. Dit lijkt ook te worden bevestigd doordat *Dickeya* vaak wel in het blad of de kraag wordt aangetoond maar minder in de knol.

In 2011 zijn twee partijen *Dahlia* vier maal getoetst op *Erwinia*. In één partij *Dahlia* is alleen in juni, voor het maaïen, een minimale besmetting van 2% met *Dickeya* aangetoond. In alle andere toetsingen aan het begin en het einde van de stekperiode en aan het einde van de teelt is in beide cultivars geen *Dickeya* aangetoond.

Het lijkt erop dat de combinatie van starten met schoon uitgangsmateriaal uit de weefselkweek en diverse hygiënische maatregelen de herbesmetting van de partijen tot een minimum beperkt. Geconstateerd is dat de hygiënische maatregelen op beide bedrijven zijn toegenomen als gevolg van het onderzoek aan *Erwinia* de afgelopen jaren en het bezoek aan de bedrijven.

6.5.3 Conclusie

In de eerste stekken die van deze Dahlia-knollen zijn geplukt/gesneden is geen *Dickeya* aangetoond. Dit is in tegenstelling tot de stekken die eind april zijn genomen, deze waren voor 2-4% besmet. Er zijn twee mogelijke opties waarom in de eerste stekken geen *Dickeya* wordt aangetoond en in de latere stekken wel. Mogelijk hebben de bacteriën meer tijd bij hogere temperatuur nodig voordat de aantallen zijn toegenomen tot een meetbaar niveau (aan het einde van de stekperiode) of er heeft tijdens de stekperiode verspreiding plaatsgevonden waardoor eerste besmette planten worden bemonsterd. Voor het maaien in juli is in cultivar KL geen *Dickeya* aangetoond en in cultivar GW minimaal 8%. Monsters van bladsap afkomstig van een lintzaag en heggenschaar waarmee Dahlia's zijn gemaaid, lieten de aanwezigheid van *Dickeya* zien. Op basis van deze resultaten kan worden gesuggereerd dat het maaien (een standaard teelthandeling) een zeer waarschijnlijke besmettingsroute voor *Dickeya* is. Dit wordt ondersteund door het feit dat *Dickeya* aan het eind van de teelt soms wel in het blad werd aangetoond maar niet in de kraag of knollen.

6.6 Volgen van partijen *Zantedeschia* op aanwezigheid van *Erwinia*

6.6.1 Inleiding

Net als bij hyacint en Dahlia is het voor *Zantedeschia* belangrijk om te weten of het uitgangsmateriaal uit weefselkweek vrij is van *Erwinia* en wanneer een besmetting ontstaat. Door twee partijen afkomstig uit weefselkweek te volgen en op een aantal momenten te bemonsteren ontstaan een indruk over de mate van (her)besmetting met mogelijk ook informatie over het moment waarop besmetting plaatsvindt. Wanneer bij *Zantedeschia* wordt gestart met weefselkweekmateriaal is het gebruikelijk dat de weefselkweekplantjes het eerste jaar in een kas worden geteeld, in bakken met potgrond bovenop de kasgrond. In deze bakken overwinteren ze grotendeels. In het voorjaar worden de (T1) knollen buiten op het veld geplant.

6.6.2 Materiaal en methode

Voor *Zantedeschia* zijn de cultivars M en BM zijn gebruikt. De bemonstering vond plaats aan 50 stekken, planten of knollen per datum (Tabel 6.5).

Van de 50 planten zijn 10 mengmonsters gemaakt met 5 planten per monster. Soms is het monster in één geheel getoetst (weefselkweekplanten of knollen), soms is het monster in onderdelen getoetst. Bij *Zantedeschia* zijn soms de onderdelen: blad, voet/ogen, knol, onderkant knol apart getoetst. Met toetsing wordt bedoeld de PCR toets die *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (Pcc) kan aantonen (zie hoofdstuk 3).

Het was de bedoeling om de partijen drie jaren te volgen. Na twee jaren werden de partijen verkocht zodat toetsen in het derde jaar niet meer mogelijk was.

Tabel 6.5. Data waarop de bemonstering van *Zantedeschia* M en BM plaatsvond

Zantedeschia	April 2009	Weefselkweekmateriaal
	Augustus 2009	Monster halverwege groeiseizoen (kas)
	Oktober 2009	Monster vóór het rooien (kas)
	Maart 2010	Monster vóór het planten (buiten)
	Oktober 2010	Monster vóór het rooien

6.6.3 Resultaten 2009

In april 2009 zijn de monsters genomen van weefselkweekplantjes van de cv's M en BM afkomstig uit steriel kuipjes met agar. In geen van de planten is *Pectobacterium* aangetoond.

In augustus 2009 zijn bij de monsternamen halverwege de teelt in de kas zowel de bladeren als de steeltjes als de kop van de knol getoetst. Bij BM is in alle mengmonsters *Pectobacterium* aangetoond (minimaal 20% besmet), in alle delen van de plant. Bij M is in 9 van de 10 mengmonsters *Pectobacterium* aangetroffen (minimaal 18% besmet) maar viermaal niet in de knol.

De knollen zijn voor de bemonstering niet uitwendig ontsmet.

Eind oktober 2009 (BM) of begin november (M) is een hele bak met plantjes uit de kas gehaald. Van BM is expres een bak gekozen waarvan de planten die erin stonden eerder begonnen te vergelen dan van de rest van de partij. Bij cv M stonden alle bakken er even goed bij. Van deze monsters zijn, afhankelijk of deze aanwezig waren, zowel de bladeren als de stengels, de kop van de knol als de wortels getoetst. De planten zijn eerst uitwendig ontsmet.

In M is in geen van de plantendelen *Pectobacterium* aangetoond. In BM is in 9 van de 10 mengmonsters (minimaal 18% besmet) *Pectobacterium* aangetoond. Hoewel *Pcc* in alle plantendelen is aangetoond zit *Pcc* vooral in het blad (75%) en de voet van het blad/bovenkant van de knol (89%) maar minder in de knollen zelf (14%).

6.6.4 Discussie Zantedeschia 2009

Het materiaal was vrij van *Pectobacterium* bij aanvang van de teelt. Reeds in augustus zijn volop bacteriën aangetoond, soms niet in de knol. De knollen zijn niet uitwendig ontsmet. Omdat in een aantal gevallen er geen bacteriën in de knol zijn aangetoond ontstaat het idee dat de besmetting van bovenaf moet komen. Bij het monster in het najaar vlak voor het rooien zijn de knollen wel uitwendig ontsmet. Bij de ene cultivar is veel en bij de andere cultivar is weinig besmetting aangetroffen. Blijkbaar bevinden zich veel bacteriën op de knol waarvan het de vraag is in hoeverre deze voor problemen kunnen zorgen.

6.6.5 Monsters 2010

In maart 2010 zijn de knollen vlak voor planten schoongemaakt. Daarna is een monster genomen. Van alle knollen zijn ogen en een knolweefsel getoetst. Bij een aantal knollen waren opgedroogde 'blaren' aan de onderkant van de knol zichtbaar. Dit opgedroogde weefsel onder de 'blaar' is bij die paar knollen apart getoetst. In alle gangbare knolmonsters werd geen *Pectobacterium* aangetoond. Bij beide partijen werd in één monster in de opgedroogde blaar *Pectobacterium* aangetoond (2% besmet).

In oktober zijn vlak voor het rooien de monsters apart met de hand gerooid. Alleen de knollen zijn getoetst met ogen en knolweefsel. De knollen zijn verschillende malen grondig met water gespoeld maar niet uitwendig ontsmet. In alle mengmonsters werd *Pectobacterium* (minimaal 20% besmet) aangetoond. Enkele knollen hadden zachte plekje, verdacht van *Pectobacterium*. Deze plekken van de knollen zijn apart getoetst (7 of 8 monsters per cultivar). Op één na (BM) is in al deze knollen *Pectobacterium* aangetoond.

Aan het einde van de bewaring zijn bijna geen bacteriën meer aangetoond, alleen in een enkele knol met een opgedroogde blaar. Het lijkt erop dat de dichtheid aan bacteriën afneemt tijdens de bewaring. Vlak voor het rooien op het veld zijn in alle mengmonsters bacteriën gevonden en ook visuele symptomen van aantasting.

6.6.6 Conclusie volgen van partijen Zantedeschia

Het onderzoek is in 2009 gestart met weefselkweekmateriaal dat na toetsing vrij bleek te zijn van *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*). Bij toetsing najaar 2009 (voor het rooien) zijn de knollen uitwendig ontsmet. Aansluitend bleek één partij vrij te zijn van *Pcc* terwijl de ander volop besmet was. Blijkbaar kan in een kas volop besmetting plaatsvinden. Knollen uit deze partijen zijn in maart nogmaals getoetst voordat deze buiten op het veld zijn geplant. In beide partijen waren enkele knollen aanwezig met aan de onderkant van de knol een opgedroogde 'blaar'. In beide partijen is in één van de monsters *Pcc* aangetoond. Aan het einde van de teelt vóór het rooien bleken alle mengmonsters van de partijen positief.

Dit resultaat betekende dat minimaal 20% van de knollen besmet was met *Pcc*. Het lijkt erop dat *Pcc* al vrij snel in ruime mate aanwezig is op de knol, zowel in de kas in het eerste jaar als op het veld in het tweede jaar. Aan het einde van de bewaring na het eerste jaar zijn bijna geen bacteriën aangetoond zodat het erop lijkt dat de dichtheid tijdens de bewaring sterk afneemt. Daarnaast wordt vaak *Pcc* aangetroffen in opgedroogde blaren aan de onderkant van de knol. Een belangrijke vraag is, of de aangetoonde *Pcc* altijd pathogene (ziekteverwekkende, virulente) isobaten zijn, of de algemeen voorkomende, niet-ziekteverwekkende *Pcc*.

7 Middelen en snel drogen

7.1 Inleiding

Middelen tegen bacteriën zijn nauwelijks beschikbaar. Voor *Erwinia* (*Dickeya* spp., *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) zijn een aantal middelen getest op zowel laboratorium- als op zeer beperkte praktijkschaal. Dit vooral omdat formaline nog maar beperkt ingezet kan worden. De middelen koperoxychloride, carvacrol en gramicidine (een antimicrobieel peptide) zijn in 2010 op laboratoriumniveau in vloeibaar medium getest voor hun werking tegen *Dickeya solani* en *Pectobacterium carotovorum* met als referentiemiddelen (het goed afdodende) formaline en Jet 5. Dit is getest in een concentratiereeks om de concentratie te vinden die nog remmend werkt.

In 2011 zijn de etherische oliën carvacrol en Nopath getest in hyacint vanwege (volgens de praktijk) een potentieel remmende werking op *Erwinia* (agressief snot). De vraag hierbij was of het aantal “snotbollen” na een ruimtebehandeling met carvacrol of Nopath bij een uitwendige besmetting van de bol (bijvoorbeeld als gevolg van een sorteerhandeling) wordt verminderd. Hyacinten van de cultivar Pink Pearl werden kunstmatig besmet met *Dickeya solani*.

Aquanox is elektrochemisch geactiveerd water. In een onderzoek aan met *Dickeya solani* geïnfecteerde hyacinten bollen is bepaald of een behandeling van Aquanox een remmend effect heeft op rot in hyacintbollen.

Erwinia beweegt en verspreidt zich via een waterfilm: zowel *Pectobacterium* en *Dickeya* spp. zijn waterminnende enterobacteriëen, die gewassen kunnen aantasten. Bij handling van bollen en knollen bij rooien en sorteren kunnen deze bacteriën vooral via beschadigingen en versmering de bollen en knollen binnendringen en door het oplossen van celwanden middels hun pectinolytisch enzymarsenaal zachtrot veroorzaken. Een standaard behandeling is het drogen van hyacintenbollen na het rooien voor een droogwand. De vraag die binnen Deltaplan C is gesteld is; hoe snel moet er gedroogd worden opdat *Erwinia* geen kans krijgt om de (in dit geval hyacinten-) bol binnen te dringen? Hiertoe zijn droogexperimenten uitgevoerd.

7.2 Middelen getest d.m.v. MIC en in vitro

7.2.1 Materiaal en methoden

MIC¹ bepaling in vloeibaar medium

Bacterie-isolaten en plantmateriaal: de bacterie-isolaten gebruikt in deze studie waren *D. solani* isolaat PPO 9134 uit hyacint en *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolaat LMG2408 (Jones 1901) uit *Zantedeschia*.

De bepaling van de Minimum Inhibitory Concentration in vloeibaar medium is volgens Kim et al., 1995 uitgevoerd. In het kort: de OD₆₀₀ werd doorgemeten na incubatie van bacterie-isolaten in vloeibaar medium (Nutrient broth, Difco) waaraan toegevoegd de te testen stof. Deze proeven werden uitgevoerd in 96 wells platen om gemakkelijk verdunningsreeksen te kunnen maken en tevens de bacteriegroei te kunnen meten.

¹ Definities: MIC = Minimum inhibition Concentration; MBC = Minimum Bactericidal Concentration = de laagste concentratie waarbij het te testen bestanddeel de bacterie doodt.

De gebruikte middelen met de concentraties staat weergegeven in Tabel 7.1. De concentratie bacteriën per microwell bij aanvang van het experiment was 10^6 cfu/ml. Platen werden 48 uur na toedienen van het middel doorgemeten. Om te controleren of toch nog enige overleving van de *Erwinia* plaats had gevonden, werd van een aantal microwells een submonster genomen, dat op nutrient agar werd uitgeplaat in afwezigheid van het te testen middel en visueel werd beoordeeld voor mogelijke groei van de bacterie.

Tabel 7.1. Overzicht van de geteste middelen met de concentratie.

Beh.	Middel	Opgelost in	verdunning	Conc (v/v;w/v)
1	Formaline (37 %)	Water	1x	0.5 %
2			10x	0.05 %
3			100x	0.005%
4	Jet 5	Water	1x	0.5 %
5			10x	0.05 %
6			100x	0.005%
7	Koperoxychloride	Water	1x	1 mg/ml
8			10x	0.1 mg/ml
9			100x	0.01 mg/ml
10	gramicidine	EtOH 96%	1x	0.4 mg/ml
11			10x	0.04 mg/ml
12			100x	0.004 mg/ml
13	Carvacrol	EtOH 96% tween	1x	0.06 %
14			6x	0.01 %
15			36x	0.016 %

Werking van carvacrol getest in een *in vitro* hyacintschijfjes assay:

Bewerking van plantmateriaal

Hyacintenbollen van de cultivar Delft Blue werden aan de buitenkant ontsmet met 70% EtOH en vervolgens in plakjes gesneden. De schijfjes werden besmet door een naald te dompelen in een suspensie van *Dickeya solani* stam PPO 9134 met een concentratie 10^8 cfu/ml. De schijfjes werden weggezet bij 24°C en na 7 dagen beoordeeld, de tijd waarin normaliter snot ontstaat bij hyacintenbollen, die kunstmatig zijn besmet.

Werking van carvacrol getest in een *in vitro* plaat assay:

Honderd µl van een suspensie van *Dickeya solani* stam PPO 9134 werd uitgeplaat op Nutrient Agar. In de deksel van de platen werd in een verdunningsreeks 10 µl carvacrol aangebracht. Platen werden weggezet bij 27 °C, waarna na 2 dagen de remmingszone op de bacteriegroei werd gemeten.

7.2.2 Resultaten

MIC bepaling in vloeibaar medium

Het effect van de geteste middelen in de verschillende concentraties op de groei van *Dickeya solani* en *Pectobacterium carotovorum* staat weergegeven in Tabel 7.2.

Tabel 7.2. Invloed van middelen op *Dickeya solani*.

Beh.	Middel	Concentratie (w/v;v/v)	Effect op <i>Dickeya solani</i>	Effect op <i>Pectobacterium</i>
1	formaline	0.5 %	+	+
2		0.05 %	+	+
3		0.005%	+	+
4	Jet 5	0.5 %	+	+
5		0.05 %	+	+
6		0.005%	-	+
7	Koperoxychloride	1 mg/ml	+	+
8		0.1 mg/ml	-	-
9		0.01 mg/ml	-	-
10	gramicidine	0.4 mg/ml	-	-
11		0.04 mg/ml	-	-
12		0.004 mg/ml	-	-
13	Carvacrol	0.06 %	+	+
14		0.01 %	-	-
15		0.016 %	-	-

- = Uitgroei van *Dickeya* = geen middel effect;



+ = Geen uitgroei van *Dickeya* = Middel effect

De MIC-bepalingen wezen uit dat Jet 5 en formaline bactericide werking vertonen. Koperoxychloride en Carvacrol vertoonden eveneens een bactericide werking, maar alleen bij de hoogste concentratie. Aangezien carvacrol een gasvormig middel is, wordt de werking mogelijk geremd in de vloeistof. Gramacidine liet geen werking zien in de geteste concentraties.

Werking van carvacrol getest in een *in vitro* hyacintschijfjes assay:

Bolschijven, die kunstmatig waren geïnfecteerd met *Dickeya chrysanthemi* LMG2804 en waaraan carvacrol aan toe was gevoegd werden na 2 en 7 dagen beoordeeld. Tabel 7.3 toont de bolschijven na 7 dagen.

Tabel 7. Overzicht bolschijven na 7 dagen

	
Watercontrole	Besmetting met 1x carvacrol

Met twee dagen zijn de schijven, waarbij carvacrol is toegevoegd blanker in vergelijking met de controles. Met zeven dagen is dit effect geheel verdwenen en zijn alle bolschijven zacht. Ook de niet geïnfecteerde bolschijven. Op sommige schijven is eveneens een aantasting door roet te zien. Dit geldt ook voor de behandelingen met carvacrol. De methode lijkt hiermee geen goede methode om een mogelijk effect van carvacrol te onderzoeken.

Werking van carvacrol getest in een *in vitro* plaat assay:

Om een mogelijk remmende werking van carvacrol op uitgroei van *Dickeya chrysanthemi* LMG 2804 op plaat te bepalen is de diameter van de zone, waarin geen bacterie groei optrad na 2 dagen gemeten.

Elke behandeling bestond uit drie herhalingen. De diameter van deze remmingszones staan weergegeven in Tabel 7.4.

Tabel 7.4. Grootte van de remmingzone in millimeter gemeten in een in vitro plaat assay met carvacrol

	Carvacrol onverdund	Carvacrol 6x verdunning	Carvacrol 36x verdunning.	EtOH (controle)
A	38 mm	40 mm	13 mm	0 mm
B	34 mm	34 mm	13 mm	0 mm
C	36 mm	40 mm	15 mm	0 mm

Onverdund = 10 µl carvacrol stock oplossing rechtstreeks van de fles toegevoegd aan een 9 cm diameter petrischaal.

Uit tabel 7.4 blijkt dat carvacrol een remmend effect heeft op de uitgroei van *Dickeya chrysanthemi* op plaat. Zes keer verdunnen van de carvacrol concentratie heeft geen effect op de grote van de remmingszone. Indien deze nog eens zes keer wordt verdund, is echter een duidelijke afname in de diameter waarin geen groei van *Dickeya* optreedt waar te nemen. De bacterie groei werd vooral geremd onder de plaats waar de carvacrol was toegevoegd. Dit duidt erop dat Carvacrol uitzakt. Voor een goede werking door een gehele ruimte is dus een goede luchtcirculatie nodig.

7.2.3 Conclusie en discussie

- Formaline (0,005%) en Jet 5 (0,05%) lieten bij een bepaling van de Minimum Inhibitory Concentration (MIC) een betere bactericide werking tegen *Erwinia*'s zien dan koperoxide (1mg/l) en carvacrol (0,06%); Gramacidine gaf bij de geteste concentraties geen werking te zien.
- Carvacrol bleek in een vitro plaat assay wel een werking tegen *Erwinia chrysanthemi* te geven, afhankelijk van de verdunning.

Van formaline en Jet 5 zijn ook ervaringen uit de praktijk en praktijkonderzoek dat ze goed kunnen werken tegen verspreiding van bacteriën bij bolontsmetting van bolgewassen. Voor de andere middelen geldt dit niet en zou meer onderzoek nodig zijn om tot een toepassing te komen. Probleem is dan nog een eventuele toelating. Overigens is Jet 5 momenteel ook niet meer toegelaten en geldt voor formaline dat toepassing alleen mag indien een ontheffing is verleend. Speciaal voor gewassen waarbij bacterieziekten een rol speelt is er jaarlijks een ontheffing verleend gedurende een bepaalde periode.

7.3 Effect van carvacrol en Nopath op een *Erwinia* infectie getest in bolla

Een mogelijk effect van de middelen carvacrol en Nopath is getest in container experiment, waarbij honderd kunstmatig besmette hyacintenbollen voor één of twee dagen aan een concentratie van deze stoffen werd blootgesteld.

7.3.1 Materiaal en methode

Een overzicht van de verschillende behandelingen staat weergegeven in Tabel 7.5. Elke behandeling werd in drie herhalingen uitgevoerd.

Tabel 7.5. Overzicht van de verschillende behandelingen voor het testen van het effect van carvacrol en Nopath

Behandeling
Carvacrol dosis 1 (26.5 µl/L), besmet
Carvacrol dosis 2 (5 µl/L), besmet
Nopath standaard dosis, besmet
Onbehandeld, besmet
Onbehandeld, niet besmet

Honderd bollen werden per herhaling 3 keer over een sorteermachine geleid om ze te beschadigen, waarna zij kunstmatig met bacteriën werden besmet. Bollen worden vervolgens overgebracht naar emmers, behandeld met carvacrol of Nopath, en afgesloten. De bollen werden bewaard bij 25°C. De lucht in de emmers werd gecirculeerd met miniventilators, die aan de binnenkant van de deksel werden bevestigd. Na één dag werden de emmers behandeld met carvacrol, korte tijd belucht, waarna een tweede dosis werd toegediend en de emmers voor nog eens 24 uur werden afgesloten. Bollen werden na 8 dagen beoordeeld.

7.3.2 Resultaten effecten middelen

Het effect van een ruimtebehandeling (in een gasdichte container) met carvacrol of Nopath bij een uitwendige besmetting van de bol (b.v. als gevolg van een sorteerhandeling) staat in figuur 7.1

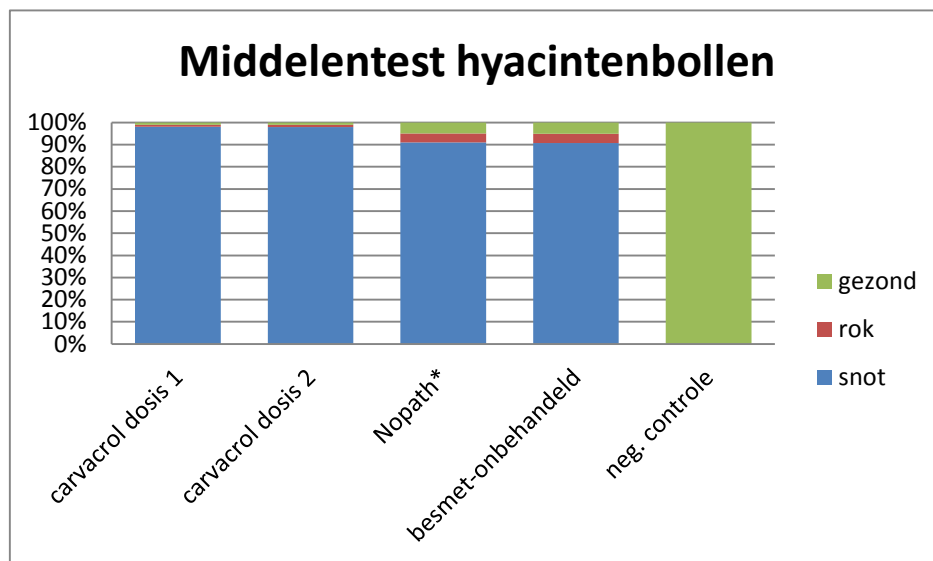


Fig. 7.1. Mate van aantasting van 100 hyacintenbollen (zie Tabel 7.5) per experiment met behandeling met carvacrol of Nopath

Figuur 7.1 laat zien dat er geen verschil werd gevonden tussen het aantal snotbollen na een ruimtebehandeling met carvacrol of Nopath en de onbehandelde controle.

7.3.3 Conclusie en discussie

- Carvacrol en Nopath lieten in dit experiment geen werking zien in de bestrijding van een beginnende *Erwinia* besmetting.
- Echter de infectiedruk waaraan de bollen werden blootgesteld was zeer hoog en was mogelijk te hoog om een effect en verschillen tussen de behandelingen en de controle zichtbaar te maken.

Door de mogelijk verkeerde keuze in de experimentele opzet kan geen conclusie worden getrokken over een mogelijke werking van carvacrol of Nopath.

7.4 Effect van drogen op infectie met *Dickeya solani*

In dit experiment is het belang van het snel drogen van hyacintenbollen onderzocht.

7.4.1 Materiaal en methode

Bollen van de hyacintencultivar China Pink werden kunstmatig besmet met *Dickeya solani* door deze door een bacterie suspensie of een prutje van gemalen hyacintendrap met *Erwinia* te rollen. Bollen werden 5, 15, 60 en 180 minuten na het smetten voor een droogwand geplaatst. Een deel van de bollen werd voordat zij voor de droogwand werd geplaatst eerst nog voor 15 minuten in formaline gedompeld. Bollen werden bewaard in gaasbakken in een cel bij 25 °C. Tabel 7.6 geeft een overzicht van de verschillende behandelingen.

Tabel 7.6. Overzicht van de verschillende behandelingen bij het drogen.

Behandeling
Bollen drogen 5 minuten na besmetten
Bollen 5 minuten na besmetten in formaline, hierna voor droogwand
Bollen drogen 15 minuten na besmetten
Bollen 15 minuten na besmetten in formaline, hierna voor droogwand
Bollen drogen 1 uur na besmetten
Bollen 1 uur na besmetten in formaline, hierna voor droogwand
Bollen drogen 3 uur na besmetten
Bollen 3 uur na besmetten in formaline, hierna voor droogwand
Bollen besmet en hierna meteen in de bewaring zonder drogen (positieve controle)
Bollen onbesmet (negatieve controle)

7.4.2 Resultaten

Het effect van de tijd, waarbij na een besmetting wordt begonnen met drogen, staat in Figuur 7.2.

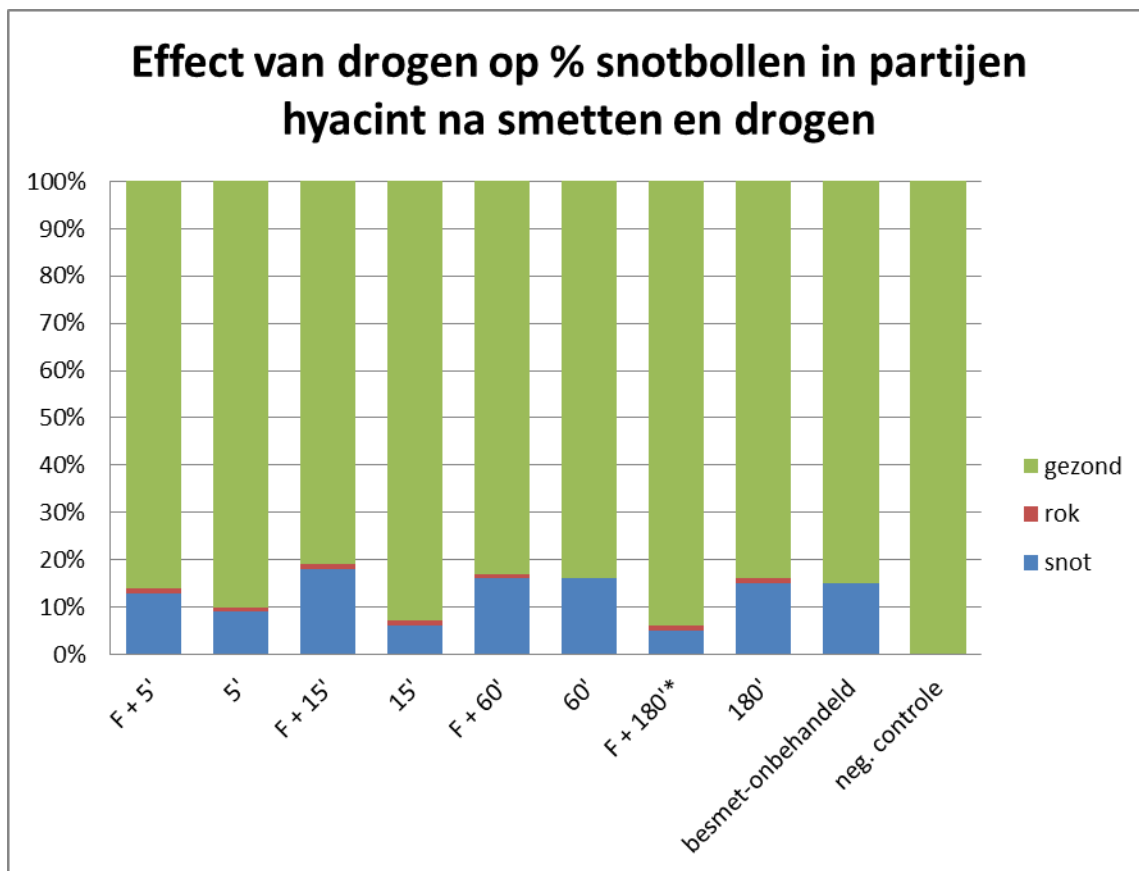


Fig. 7.2. Effect van het tijdstip van de start van het drogen na het aanbrengen van een besmetting (behandelingen 5, 15, 60 of 180 minuten na besmetting) op de mate van rotontwikkeling in de met *Dickeya solani* besmette hyacintenbollen. Rok = alleen oppervlakkige rotting. F = behandeling met drogen en formaline, ' = afkorting voor minuten.

Figuur 7.2 laat zien, dat het drogen na vijf of meer minuten na het aanbrengen van een besmetting, door de bollen door een suspensie met de ziekteverwekker rollen geen invloed meer heeft op het uiteindelijke aantal snotbollen, dat tijdens de bewaring ontstaat. Ook niet als de behandeling gecombineerd wordt met een formaline behandeling.

Een experiment waarbij een prutje van hyacintendrap met *Erwinia* op de bollen werd aangebracht na beschadiging liet voor drogen ook geen effect zien (Figuur 7.3)

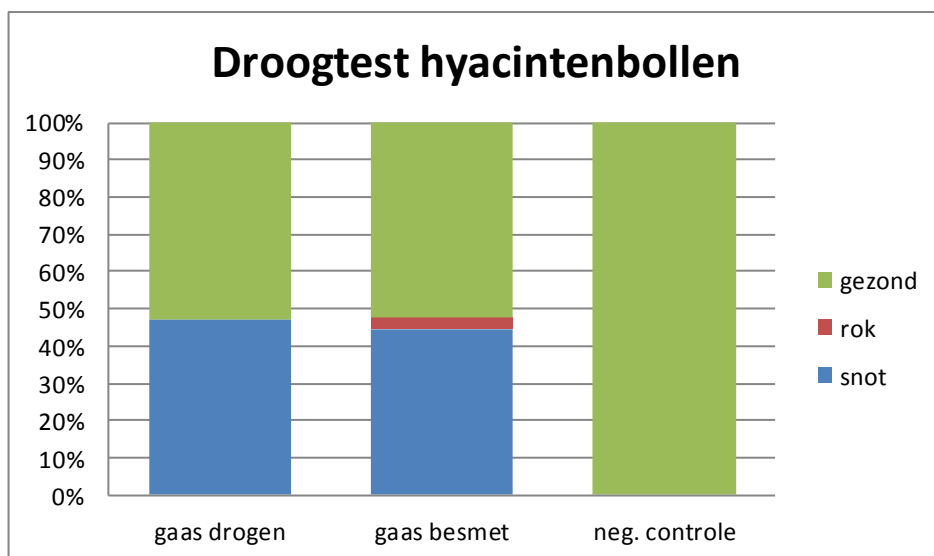


Fig. 7.3. Effect van drogen na het aanbrengen van een besmetting via een prutje op de mate van rotontwikkeling in de met *Dickeya solani* besmette hyacintenbollen. Gaas drogen = gaasbak met ziek bolmateriaal besmet, gevolgd door gezonde bollen, en direct daarna voor droogwand; gaas besmet = gaasbak met ziek bolmateriaal besmet, gevolgd door gezonde bollen, bollen niet gedroogd, neg controle = bollen over niet besmette gaasbak. Rok = alleen oppervlakkige rotting.

Zoals uit Figuur 7.3 blijkt, is er in deze opzet geen verschil in aantal snotbollen gevonden door de bollen na het aanbrengen van een besmetting, wel of niet te drogen. In de onbesmette controle werden geen snotbollen aangetroffen.

Op schalen met bacteriën werd na 72 uur drogen nog levende bacteriën (*Dickeya* en *Pcc*) aangetoond.

7.4.3 Conclusie en discussie

- Er bleek geen duidelijk verschil tussen het moment waarop met drogen werd begonnen (van 5 tot 180 minuten) en het uiteindelijk aantal snotbollen, dat in de diverse behandelingen tijdens de bewaring werd gevonden.
- Daarnaast bleek formaline hier niet effectief te zijn.

Het lijkt dat met deze mate van verwonding van de bol en de hoge infectiedruk, die werd aangebracht de bacterie aan een paar minuten al genoeg heeft om een aantasting te geven. Aangenomen wordt dat snel drogen van de bollen essentieel is om verdere versmering te voorkomen en dat dit zo snel mogelijk moet beginnen. De resultaten geven echter aan dat de bacterie- infectie erg snel in de bol zit en dat ontsmetting in formaline of drogen weinig effect meer lijkt te hebben. Aangenomen wordt dat een ontsmetting wel kan bijdragen aan het voorkomen van verdere verspreiding.

7.5 Effect van Aquanox op hyacintenbollen met snot

7.5.1 Inleiding

Aquanox is een handelsproduct, gebaseerd op elektrochemisch geactiveerd water (komt voor onder verschillende merknamen). De werking is alleen oppervlakkig en moet goed toegepast worden in verband met kans op gewasschade, corrosie van materialen en kans op persoonlijk letsel.

In laboratoriumtests is meestal gekeken naar overleving van het doelorganisme na gebruik (meestal eenmalig gebruik) via ultrasone verneveling van verschillende concentraties Aquanox, spuitbehandelingen en aangietbehandeling (10% Aquanox). Voor een korte analyse voor toepassing in de bollensector is in 2011 een rapport verschenen (Duyvensteijn et al. 2011). Een licht dodend effect is geconstateerd bij witte vlieg (12 % afname), spintmijt (19 %) en Californische trips (6 %), en *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (mycelium).

Een direct dodend effect is waargenomen op sporensuspensies, die veelal gevoeliger zijn. Voor de bacterie *Dickeya solani* isolaat PPO 9134 werd eerder met Aquanox in een plaatassay doding gevonden. Op verzoek van telers is het effect van Aquanox op oppervlakkig geïnfecteerde hyacintebollen getest.

Het doel van dit experiment met Aquanox was om te bepalen of een behandeling van Aquanox een effect heeft op de vorming van snot in hyacintebollen na het aanbrengen van een kunstmatige besmetting met *Dickeya solani* op de bol huid.

7.5.2 Materiaal en methode

Bacteriën:

Voor de kunstmatige infectie werd *D. solani* isolaat PPO 9134 gebruikt.

Bolmateriaal:

Hyacint China Pink

De eigenschappen van het gebruikte electrochemisch geactiveerd water (Aquanox) waren de volgende:

- 157 mg/l vrij actief chloor (Dit is hoog: 50 mg/l bleek eerder al voldoende voor de doding van *Erwinia* in 5 minuten in een plaatassay).
- pH: 7.62-7.65
- ORP: 747-758 mV (instelling apparaat voor elektrische inductie van het water)

Methode:

Bollen werden licht beschadigd om ingangen te creëren voor *D. solani* door de bollen 2x over een sorteermachine te leiden en vervolgens te besmetten met een bacterie suspensie van 10^7 cfu/ml.

Bollen werden na het aanbrengen van de *Dickeya* besmetting in een plastic container geplaatst, waarna Aquanox voor 1, 5 en 10 minuten in de box werd verneveld. De RV werd hierbij rond de 90-95% gehouden. Na de behandeling werden de bollen bij 27 °C bewaard en na 8 dagen visueel beoordeeld op snot. Om de directe werking van Aquanox op de aanwezige *Erwinia* op de huid van de bol te bepalen werd per behandeling bij twee bollen nadat deze met Aquanox waren behandeld een stukje uit de bol gesneden en op de aanwezigheid van levende *Dickeya* bacteriën getoetst.

7.5.3 Resultaten

Bollen werden bij de Aquanox behandelingen wat vochtig door dauwdruppeltjes op de bol. Dit kan een mogelijk negatief effect hebben op de effectiviteit van het middel. Tabel 7.7 geeft een overzicht van het aantal snotbollen, dat werd gevonden 8 dagen na het toepassen van de verschillende behandelingen.

Tabel 7.7 Aantallen snotbollen per behandeling 8 dagen na het smetten het toedienen van de Aquanox behandeling.

Behandeling	herhaling	Aantal snotbollen	Gemiddeld aantal snotbollen voor de behandeling
Onbehandeld, bollen besmet	A	8	5
	B	2	
	C	4	
1 minuut Aquanox, bollen besmet	A	2	3
	B	4	
	C	2	
5 minuten Aquanox, bollen besmet	A	7	5
	B	5	
	C	3	
10 minuten Aquanox, bollen besmet	A	5	4
	B	3	
	C	4	

De spreiding tussen de aantallen snotbollen binnen een behandeling voor de drie herhalingen is groot. Er is geen behandeling waar geen snotters zijn gevonden. Ook werd bij alle behandelingen met Aquanox overleving van *Dickeya* op de huid gevonden. Het gemiddelde aantal snotbollen voor de verschillende behandelingen lijkt vergelijkbaar met de onbehandelde controle. Het percentage snotbollen in de behandelde en onbehandelde curverkratjes was respectievelijk 32 en 25 %. Er is geen bestrijdend effect van de behandeling met Aquanox gevonden

Bij beoordeling van de werking van Aquanox op de bolstukjes bleek dat de bacteriën de behandeling overleefd hadden.

7.5.4 Conclusie en discussie

- Onder deze proefomstandigheden is voor Aquanox geen werking tegen *Erwinia* gevonden. In de behandelingen en de onbehandelde controle werden vergelijkbare aantallen snotbollen gevonden.
- Ook werd overleving van *Erwinia* op de (beschadigde) bolhuid gevonden.

Met bacteriën op plaat is eerder wel een werking van Aquanox aangetoond (Duyvensteijn et al. 2011). Dit verschil in uitkomst kan mogelijk worden verklaard door:

1. De oppervlakkige werking van Aquanox. In dit experiment werd de bol beschadigd, waarna deze met *Erwinia* werd besmet. Mogelijk blijft een werking van Aquanox achterwege doordat de bacterie in staat is de bol snel binnen te dringen, waarna zij door het weefsel wordt beschermd. In een plaat assay ligt de bacterie oppervlakkig, waardoor Aquanox goed op de bacterie kan inwerken.
2. Het effect van Aquanox kan negatief worden beïnvloed door dauwvorming. Als inoculatie-methode is water gebruikt. Hoewel de bollen niet door en door nat worden is de buitenkant bij het inzetten toch licht vochtig. Mogelijk dat hierdoor een meetbaar effect uitbleef.

Indien vocht inderdaad de werking van Aquanox teniet doet is de vraag of de methode op deze manier is toe te passen in de praktijk. Bollen zullen indien de behandeling direct na het rooien wordt toegepast nooit geheel droog zijn. Op het moment dat de bollen wel droog zijn, bijvoorbeeld nadat zij voor een droogwand hebben gestaan, zal op dat moment ook weinig verspreiding van de bacterie plaatsvinden. Bovendien is het waarschijnlijk, dat pas later in de bewaring worden behandeld de initiële infectie al heeft plaatsgevonden en niet meer te bereiken is door de oppervlakkige werking van Aquanox.

7.6 Verspreiding van *Erwinia* via de lucht

7.6.1 Inleiding

Bij het drogen wordt veel lucht door de kisten of gaasbakken met bollen geblazen. Daarbij zou de lucht mogelijk bacteriën mee kunnen nemen van besmette bollen en andere gezonde bollen kunnen besmetten. Bij rooien zijn de bollen licht beschadigd en staan de neuzen veelal open. De vraag is of er aangetoond kan worden of er bacteriën in de drooglucht aanwezig zijn en of de bollen daardoor besmet kunnen worden.

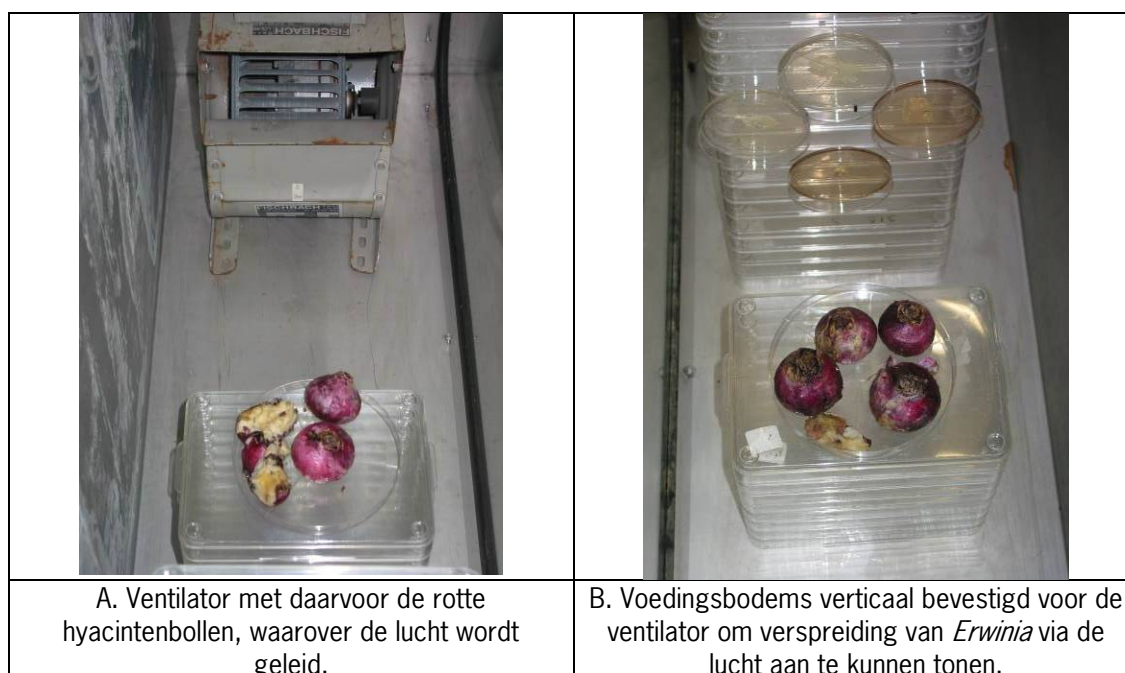
7.6.2 Materiaal en methode

In 2008 is een experiment uitgevoerd met zieke bollen waarvan de neus was afgesneden en waardoor aangetast bolrokweefsel zichtbaar was. Over deze zieke bollen werd gedurende verschillende tijdsduren (5 minuten tot 1 uur) lucht geleid, die daarna langs schalen geleid werd met een voor *Erwinia* geschikte voedingsbodem en op verschillende afstanden (0,25 m- 2 m) van de besmettingsbron. Een vergelijkbaar experiment vond plaats door de lucht langs kweekschalen met *Dickeya* te leiden en op te vangen in de schalen met de voor *Erwinia* geschikte voedingsbodem. Tabel 7.8 en figuur 7.4 tonen respectievelijk een overzicht van de verschillende behandelingen en de proefopstelling.

Tabel 7.8. Overzicht van de verschillende behandelingen.

bron	Duur van lucht toevoer	Afstand tot besmettings bron
<i>Dickeya</i> op schaal	5, 10, 30 en 60 minuten	0,25; 0,5; 1 en 2 meter
snotbol	5, 10, 30 en 60 minuten	0,25; 0,5; 1 en 2 meter

In 2009 is op een bedrijf een vergelijkbaar experiment uitgevoerd, waarbij tijdens het drogen van besmette partijen voor de droogwand de door de kisten gaande lucht over voedingsbodems werd geleid, waarna de voedingsbodems op de aanwezigheid van *Erwinia* werden beoordeeld.



7.6.3 Resultaten

Bij het experiment waarbij lucht over bacterieplaten danwel zieke hyacinten werd geleid en werd opgevangen, werd nadien geen *Erwinia* op de platen aangetroffen. Ook voor het praktijkexperiment in 2009, waarbij de lucht werd opgevangen dat tijdens het drogen van besmette partijen voor de droogwand de door de kisten werd gevoerd werd nadien geen *Erwinia* aangetoond. Hierdoor lijkt het gevaar van *Dickeya* verspreiding tijdens het drogen na rooien van hyacintenbollen niet aannemelijk.

7.6.4 Conclusie en discussie

- Van lucht geleid over zieke bollen of schalen met bacteriën kon niet worden aangetoond dat daarmee ook bacteriën werden verspreid.

Bij het verhakselen van gewas (aardappel) is wel bekend dat er in dat materiaal bacteriën zitten en door de lucht kunnen worden verspreid. Blijkbaar is er meer nodig dan alleen lucht om bacteriën te verspreiden. Een luchtstroom zal wel bijdragen aan het opdrogen van een aangetaste bol en daardoor verdere verspreiding beperken door voorkomen dat bijvoorbeeld de inhoud van bollen die leeglopen op andere bollen terecht komt. Verspreiding bij het drogen lijkt hier dus niet op te treden.

8 *Erwinia*-overleg met de aardappelensector

In 2010 en 2012 heeft uitgebreid overleg plaatsgevonden met HZPC in Metslawier over het lopende praktijkonderzoek aan *Erwinia* in zowel bloembollen als pootaardappelen. De researchafdeling van HZPC (D. Boomsma en medewerkers) namen het C-deel van het *Erwinia* Deltaplan C-deel (aardappelen) voor hun rekening. De eindrapportage is gepubliceerd (Deltaplan *Erwinia* deel C-Pootaardappelen, 2012).

Gemeenschappelijke vragen liggen o.a. op het gebied van het vaststellen waar *Erwinia* de productieketen binnen kan dringen en op het toepassen van middelen of apparatuur om infectie te voorkomen (bijvoorbeeld snel drogen van partijen bollen/knollen op het veld). Ook het toetsen van weefselkweekplanten (ook aardappel), toepassing van VNTRs om isolaten te karakteriseren en te kunnen volgen in partijen is interessant voor het aardappelpraktijkonderzoek. Op deze gebieden zal worden getracht samen te werken. Hiertoe vonden jaarlijks bijeenkomsten plaats van verschillende commissies, betrokken bij het “aardappel” *Erwinia* Deltaplan waar PPO en in sommige gevallen KAVB bij aansloten.

De commissie deltaplan *Erwinia* (aardappel) controleert en stuurt het project op hoofdlijnen en zie toe dat het project financieel binnen de gestelde kaders blijft.

De projectcommissie Pootaardappelen begeleidt de uitvoerders van het pootaardappelonderzoek in Deel B en C. Daarnaast neemt een afvaardiging van de projectcommissie deel aan de onderzoeksoverleggroep. Begeleidingscommissie Bloembollen

De begeleidingscommissie Bloembollen (KAVB, voorzitters Productgroepen Bloembolgewassen, Anthos, PRI, NAK, Allefs) begeleidt de uitvoerders van het bloembollenonderzoek in deel C. Daarnaast neemt een afvaardiging van de begeleidingscommissie deel aan de onderzoeksoverleggroep.

De onderzoeksoverleggroep heeft een tweeledige functie: [1] Hij adviseert de uitvoerders van het onderzoek in deel A en zorgt ervoor dat het onderzoek in deel A desgewenst afgestemd wordt op het uitgevoerde onderzoek in deel C (klankbordfunctie). [2] Voorts draagt de onderzoeksoverleggroep zorg voor het inhoudelijk dwarsverband tussenonderzoek aan pootaardappelen en bloembollen zodat het synergievoordeel wordt gerealiseerd. De onderzoeksoverleggroep komt ten minste 2 keer per jaar bijeen. In de onderzoeksoverleggroep zit een afvaardiging van de projectcommissie Pootaardappelen, een afvaardiging van de begeleidingscommissie Bloembollen en meest betrokken onderzoekers van PRI en PPO Lisse en keuringsdienst(en).

Vanaf februari 2009 zijn Delen C van het Deltaplan van start en de genoemde overlegstructuren ingevuld. Dit betekende dat jaarlijks twee bijeenkomsten plaatsvonden met bovengenoemde overlegstructuren (onderzoeksoverleggroep, projectcommissie). Apart hiervan vond dan de begeleidingscommissie Deltaplan C Bloembollen plaats met enkele vertegenwoordigers van de aardappelwereld (NAK, Agrico) waar specifiek de voortgang en planning van het Deltaplan C Bloembollen werd besproken.

Speerpunten in het *Erwinia*-Deltaplan C pootaardappel waren:

1. Initiële besmetting. Hoe en wanneer raken vermeerderingen uit *Erwinia*-vrije miniknollen en ook plantmateriaal uit stekken en zaden besmet?
2. Versmering. Hoe kan de opbouw van *Erwinia* na initiële besmetting tot een minimum worden gereduceerd?
3. Detectie en epidemiologie: welke types *Erwinia* zijn er, welke detectiemethodes beschikbaar en hoe kan monsterbewerking hiervoor geoptimaliseerd worden?
4. Bewaring: hoe snel hecht *Erwinia* aan de aardappelschil en hoe dit te reduceren (variatie in droogregimes)
5. Kennisoverdracht: nieuwsbrieven, artikelen, demodagen en telersbijeenkomsten.

9 Discussie

9.1 Enquête

Door middel van een enquête onder hyacintentelers is een goed inzicht gekregen in de ervaringen die telers hebben met agressief snot en de effectiviteit van door hen genomen maatregelen. Hoewel het aantal terugontvangen formulieren (60 van de 185) hoger had mogen zijn gezien de ernst van het probleem *Erwinia*, is het aantal representatief genoeg voor een aantal conclusies en aanbevelingen. Belangrijk is te weten welke maatregelen effectief zijn gebleken en welke vragen over *Erwinia* er nog leven.

De respons was vergelijkbaar met de(veel) uitgebreidere enquête die in 2003 werd gehouden.

Het onderscheid tussen witsnot en agressief snot in hyacinten was voor veel van de telers moeilijk.

Twee derde van de bedrijven had vooral vanaf 2005 last van agressief snot waarbij de ernst in de loop der jaren meestal wel afnam, maar men kwam er niet geheel van af. De door het *Erwinia*-onderzoek bekend geworden informatie over agressief snot heeft op de bedrijven wel geleid tot vermindering van de aantasting. Opvallend is, dat er al in de 90-er jaren melding wordt gemaakt van agressief snot. Hier heeft PPO geen isolaten van.

In 2008 had 25% van de bedrijven minimaal met 1 partij met 10% of meer aantasting te maken; slechts een klein aantal had nooit last van enige vorm van snot. Deze telers zijn van groot belang om nader gevisiteerd en bevraagd te worden. Indien aantasting werd aangetroffen, dan trad deze meestal op tijdens de bewaring in oudere partijen van bepaalde cultivars.

Sommige cultivars werden zowel erg gevoelig als ongevoelig genoemd; dit fenomeen duidt dan op vooral partijbesmettingen. De oorzaak kon men moeilijk aangeven, maar genoemd werden de aspecten verwerking, het weer en de kwaliteit van werkbollen.

Veel genoemde effectieve maatregelen ter voorkoming van een aantasting waren: beschadiging voorkomen, laat en koel verwerken, met gaasbakken werken, gezonde werkbollen gebruiken en voorzichtig uitzoeken.

Sommige van deze maatregelen werden echter ook door enkele bedrijven als niet uitvoerbaar gezien. Het aantal genoemde niet-effectieve maatregelen was kleiner: o.a. ontsmetting, uitzoeken en een ruimtebehandeling.

Bedrijven vonden dat er meer aandacht zou moeten zijn voor gezond uitgangsmateriaal, het areaal saneren, beschadiging voorkomen, goed drogen, koel verwerken en pas na de heetstook sorteren. Wat betreft gezond uitgangsmateriaal is onderzoek verricht binnen het project "Snelle toetsen op zuur, snot en bolrot" waar zowel een praktijktoets is ontwikkeld als wel een validatie om gepoolde partijen hyacinten bij de NAK te laten toetsen op *Dickeya*.

Vrijwel alle bedrijven (98%) zouden een toets, mits betrouwbaar en betaalbaar, willen inzetten vooral bij werkbollen. Wat betaalbaar is, was niet in de enquête opgenomen; de door de NAK aangeboden toets was toen nog niet bekend.

De meest gestelde vragen betroffen vooral hoe een aantasting te voorkomen en waar de besmetting vandaan komt. Geheel nieuwe vragen omtrent *Erwinia* werden niet aangegeven door de telers.

9.2 Toetsmethoden en isolaten van *Erwinia*'s

In praktijkmonsters zijn de *Dickeya*-soorten *dadantii*, *dianthicola* en *solani* aangetroffen in verschillende bolgewassen zoals hyacint, Dahlia, iris, Muscari en narcis. Van bovengenoemde gewassen lijkt *D. dianthicola* alleen Dahlia aan te tasten. *D. dadantii* komt voor in de gewassen narcis, Brodiaea, hyacint, Ixia, Freesia en iris. *D. solani* is in hyacint en in Muscari aangetroffen. *D. solani* komt ook voor in aardappel. Voor epidemiologisch onderzoek is een isolaat-specifieke karakterisatie van *Dickeya* dan wel *Pectobacterium*-soorten handig om zo bv. verspreiding te onderzoeken.

Dit wordt momenteel succesvol toegepast voor bv. *xanthomonaden* in fruitbomen. Voor *D. dianthicola* en *D. dadantii* zijn polymorfismen gevonden tussen isolaten met twee ontwikkelde VNTR's. Dit biedt mogelijk perspectief voor karakterisatie op isolaatniveau voor deze twee soorten. *D. solani* was met de ontwikkelde VNTR's niet op isolaatniveau te onderscheiden. Mogelijk dat dit met een andere combinatie aan primers wel mogelijk is. Daarentegen kan dit er ook op duiden dat er binnen deze soort weinig variatie bestaat. Voor *Pectobacterium* was wel onderscheid mogelijk tussen isolaten uit bloembolgewassen enerzijds, en isolaten verkregen uit aardappel anderzijds. Momenteel is bekend dat er nu verder onderscheid binnen de soort *Pcc* wordt gemaakt; er zijn nieuwe soorten gedefinieerd wat het verschil tussen deze groepen mogelijk kan verklaren. Nieuwe genomische informatie van deze nieuwe soorten zal de ontwikkeling van nieuwe VNTRs vergemakkelijken en de karakterisatie op isolaatniveau wellicht mogelijk maken om zo de verspreiding van isolaten van *Pcc* en nieuwe soorten te kunnen volgen.

9.3 Resistentie en tolerantie

In het project "Beheersing van *Erwinia*" (afgesloten in 2008) is gebleken dat er een duidelijk verschil in gevoeligheid in enkele Dahlia cultivars voor *Dickeya dianthicola* bestond in een zg. aanprijsproef. Dit was aanleiding om in het vervolgonderzoek Deltaplan *Erwinia* het aspect van mogelijke resistentie (beter is te spreken van tolerantie) bij Dahlia te onderzoeken.

Ook in *Zantedeschia* cultivars is variatie in gevoeligheid voor *Pcc* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, het stinkend zachtrot) geconstateerd. Deze waarneming is binnen dit projectonderdeel van Deltaplan *Erwinia* eveneens nader onderzocht.

Het is beter te spreken van tolerantie of "meer of minder" gevoelig voor *Pcc* dan te spreken over resistentie. Tot nu toe is er immers geen absolute ongevoeligheid (resistentie) bij *Zantedeschia* waargenomen.

Op het veld bleken Dahlia-cultivars gevoelig te zijn voor *Dickeya dianthicola* maar niet voor *D. solani*. Dit komt overeen met de ervaring dat in Dahlia uitsluitend *D. dianthicola* wordt aangetroffen zoals onderzocht in de analyse van veel rotmonsters van Dahlia ("ploffers"). Het percentage uitval na besmetting met *D. dianthicola* varieerde tussen de verschillende cultivars van minimaal 9 % tot maximaal 56%. Er lijken dus verschillen in gevoeligheid voor *D. dianthicola* te bestaan, hoewel dit in herhalingsexperimenten met stekken niet duidelijk reproduceerbaar was, mogelijk door de te kleine proef (te weinig plantmateriaal beschikbaar voor significante verschillen). Opvallend was, dat in gezond ogende planten in PCR (TaqMan) latente besmetting met *D. dianthicola* of *D. solani* werd waargenomen, afhankelijk met welk isolaat deze partijen waren besmet. Dit geeft aan dat *Erwinia*'s symptomeloos aanwezig kunnen zijn, een fenomeen wat ook bij hyacint bekend is. Latent besmette knollen met *D. dianthicola* konden later wegvallen terwijl uitval bij knollen besmet met *D. solani* niet is waargenomen.

Zantedeschia is een belangrijk siergewas in Nederland waar grote aantallen van worden geproduceerd. De meest voorkomende aantastingen worden veroorzaakt door *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) en *Pseudomonas* subsp. zoals *Pseudomonas marginalis*.

Naast hygiëne en preventie door gevoelige detectiemethoden is de bevordering van cultivarresistentie een mogelijkheid tot oplossing van dit "rot"-probleem. Het vaststellen van eventuele resistentieniveau's (beter te spreken van mogelijk tolerantie) in bestaande cultivars is van belang voor kwekers en veredelaars.

In het eerste jaar lieten een aantal cultivars zien minder gevoelig te zijn voor *Pcc* dan andere cultivars. In het tweede jaar bleken deze resultaten niet reproduceerbaar te zijn.

Zowel de bladpunsjes als de knoltoets laten (soms) verschillen tussen cultivars zien maar deze blijken niet reproduceerbaar. Het is onduidelijk of met het optimaliseren van de toetsen (standaard materiaal gebruiken, een nog lagere concentratie *Pcc*) deze wel reproduceerbaar wordt. De variatie in de beide toetsen is deels te verklaren doordat bijvoorbeeld bladeren van de ene gebruikte cultivar kleiner en mogelijk fragieler waren dan de andere cv's terwijl voor beide wel gelijkwaardig knoluitgangsmateriaal (T1) was gebruikt.

Bladmorfologie of groeistadium (bladleeftijd) kunnen mogelijk effect hebben op variatie binnen de resistentietoetsen inzake een hogere gevoeligheid voor de bacteriën.

Voor deze resistentietoetsen is bewust gekozen voor T1-knollen om zo eventuele latente infecties met andere bacteriën tot een minimum te beperken die de aantasting door de experimenteel toegevoegde *Pcc* of *Pseudomonas* zou kunnen beïnvloeden.

Hoewel pseudomonaden bijdragen aan bacterierot in *Zantedeschia* en andere gewassen toonde de bladponsjestoets dat *Pcc* tot de agressieve rotveroorzakers behoort en veel hogere pectolytische activiteit vertoonde in de resistentietoetsen.

De bladponsjestoets is gevoelig voor variatie, maar kan mogelijk bij nauwkeurig gebruikt volgens vast protocol, tezamen met in vivo toets en veldobservaties bij *Zantedeschia* cultivars een extra (kwantitatieve) middel zijn voor veredelaars om gevoeligheid/tolerantie van *Zantedeschia* cv's in kaart te brengen. Op deze wijze kan resistentie in bestaande genitoren tegen *Pcc* gebruikt worden om op nieuwe, meer tolerante cv's te veredelen.

Naast meer of minder tolerante cv's is een andere benadering de weerstand van de plant te verbeteren door toediening van zg. antagonistische organismen, of het toedienen van zg. elicitoren: stoffen die de afweerreactie van de plant aanzetten. Deze stoffen zetten bv. de salicylzuurroute van de plant aan, die zorgt voor een verhoogde reactie tegen binnendringende bacteriën. Dit onderzoek vindt momenteel plaats binnen het Deltaplan B onderzoek en toont al enkele hoopvolle resultaten.

9.4 Volgen van partijen op *Erwinia*-aantasting

Een van de vragen uit de enquête onder hyacintentelers was in hoeverre partijen hyacinten, vrij van agressief snot, in de jaren ook vrij bleven van *Erwinia*-aantasting. Een onderdeel van de vraagstelling betreft wat nu de infectieroute van *Erwinia*'s is: hoe komen ze de plant binnen? Tevens is de vraag gesteld of agressief snot in het veld te herkennen is aan specifieke symptomen, vergelijkbaar met die van het veel langer bekende witsnot (*Pcc*).

Daarnaast is informatie verkregen over partijen hyacint die in de tijd gevolgd zijn. Dit is tevens aan de orde geweest in een ander verband in het project "snelle toetsen" waar partijen gedurende enkele jaren getoetst zijn in zowel de thuistoets als bij de toets die de NAK uitvoert (DNA-toets op gepoolde steekproeven hyacintenbollen). Ook zijn experimenten aan *Dahlia* en *Zantedeschia* uitgevoerd om meer over de kans op besmetting in de teelt te weten te komen.

Bij hyacint treden de meeste problemen met agressief snot op tijdens de verwerking en bewaring bij hogere temperaturen. Daarnaast is gezien dat infectie van hyacint volgens zg. waterbroeiexperimenten vrijwel uitsluitend via de bolbodem op te treden op moment van het doorbreken van de wortels. Wanneer de wortels doorgebroken zijn, vindt nauwelijks nog aantasting plaats. Dit is anders als wat men heeft gevonden bij aardappel. Als kanttekening moet geplaatst worden, dat in bv. potproeven wel infectie via beschadigde wortels (bv. door zandkorrels enz.) zou kunnen optreden. Aangietproeven zijn wel uitgevoerd (niet getoond) maar leverde nog weinig informatie op. Dit is mogelijk toekomstig onderzoek.

Analyse van een met *D. solani* besmette partij hyacinten, opgeplant op een proefveld leverde nauwelijks of geen aanwijzing op dat agressief snot speciale symptomen geeft. De enige positieve analyse op *Dickeya*, met PCR gecontroleerd, was een monster van een plant zonder symptomen en was *Dickeya* blijkbaar latent in deze plant aanwezig. Vooralsnog helaas geen visuele aanknopingspunten om via ziekzoeken besmetting met agressief snot te velde aan te tonen.

Uit onderzoek via analyse van partijen hyacinten met verschillende geschiedenissen (altijd gezond, geringe aantasting of duidelijk aangetast door agressief snot) en gesprekken op diverse hyacintenbedrijven, waar een besmetting met *Erwinia* (onverwacht) optrad, werd duidelijk dat het heel moeilijk is om de mogelijke oorzaak te achterhalen. De informatie over omstandigheden ontbreekt veelal en eventuele latente besmetting met *Dickeya* kan aanwezig zijn geweest maar is niet vastgesteld. Ook komt de aantasting door *Erwinia* soms slechts in een deel van de partij voor en blijkt het lastig voor de praktijk om partijen/jaargangen goed gescheiden te houden. Men weet vaak niet of de *Erwinia*-aantasting nu agressief snot of witsnot is. Hiervoor zou toetsen met de thuistoets en/of de NAK toets duidelijkheid kunnen geven. In een ander project ('Ontwikkeling van praktijktoetsen voor zuur, snot en bolrot' (Van Doorn et al, 2013) bleek de verder ontwikkelde thuistoets voor hyacint goed overeen te komen met de NAK-toets.

In een project gestart in 2012 "(Aanzet voor keuring op *Dickeya* in werkbollen van Delft Blue", Peter Vreeburg et al. 2013) zijn op het oog gezonde werkbollen van een aantal partijen van één cultivar getest op aanwezigheid van *Dickeya*. Daarnaast is ook nog plantmateriaal getest dat bestemd was voor werkbollen een jaar later. De resultaten gaven aan dat ca. 30% van de partijen besmet was. Er was ook een goede relatie tussen de resultaten van beide jaargangen op het zelfde bedrijf. Dit was reden om in zomer 2013 bijna alle partijen die opgeplant gaan worden voor werkbollen in 2014 verplicht te laten toetsen. Doel is beter zicht te krijgen op de besmetting in de gehele teelt en op basis daarvan verdere stappen te ondernemen om de aantasting terug te dringen.

Al deze resultaten dragen bij aan de hypothese, dat een gezonde partij (geen symptomen en geen latent aanwezige *Erwinia*) *Erwinia*-vrij kan blijven, terwijl een (licht-) besmette partij hyacinten vroeg of laat symptomen van agressief snot zal gaan vertonen.

Net als voor hyacint en *Zantedeschia* is het belangrijk te weten voor *Dahlia* in hoeverre gezonde partijen schoon en vrij van met name *D. dianthicola* blijven. Hiertoe zijn gedurende 3 jaar waarnemingen gedaan waarbij is gestart met weefselkweekmateriaal wat na toetsting vrij van *Dickeya* bleek te zijn. Aan het eind van de teelt op het veld bleken enkele knollen besmet te zijn. In de eerste stekken die van deze *Dahlia* knollen zijn geplukt/gesneden is geen *Dickeya* aangetoond. Aan het eind van het stekseizoen was een klein percentage van de stekken wel besmet. Monsters van bladsap afkomstig van een lintzaag en heggenchaar waarmee *Dahlia*'s zijn gemaaid, lieten de aanwezigheid van *Dickeya* zien. Op basis van deze resultaten lijkt het aannemelijk dat het maaien (een standaard teelthandeling) een zeer waarschijnlijke besmettingsroute voor *Dickeya* is. Ook verdient het aanbeveling uitgangsmateriaal te toetsen specifiek op *D. dianthicola*. Hiervoor is een gevoelige PCR toets beschikbaar. Na enkele jaren telen was de besmetting op de onderzochte bedrijven nog steeds laag waaruit blijkt dat met de start van gezond uitgangsmateriaal en goede bedrijfshygiënische maatregelen een vrijwel ziekte-vrije teelt mogelijk lijkt.

Een belangrijke vraag voor de praktijk is, wanneer en hoe een partij *Zantedeschia*, geteeld vanuit weefselkweek, besmet raakt met vooral *Pcc*. Kennis hieromtrent kan helpen om besmetting te voorkomen. Hiertoe zijn gedurende drie jaar twee partijen *Zantedeschia* gevolgd vanuit weefselkweekplantjes van 2009 die op twee kwekerijen zijn afgeleverd. Twee- of driemaal per jaar zijn een groot aantal planten uit deze partijen getoetst met een DNA-test op *Pcc*. Bij aanvang in 2009 is geen *Pcc* aangetoond in het uitgangsmateriaal. In het eerste jaar, terwijl de planten in de kas stonden, werd al een lichte besmetting met *Pcc* aangetoond ondanks alle maatregelen op deze bedrijven om dit te voorkomen. Bij de toetsing van de twee partijen vlak voor het planten in 2010 kon in een van de partijen geen *Pcc* worden aangetoond. In de andere partij kon alleen *Pcc* worden aangetoond in een zogenaamde opgedroogde blaar aan de onderkant van de knol. Echter, een monster vlak voor de knoelooft van 2010 liet weer wel een vrij grote besmetting met *Pcc* zien, terwijl toetsing van de knollen na de bewaring (maart 2011) bijna geen besmetting liet zien. De conclusie is, dat de knollen tijdens de teelt klaarblijkelijk besmet raken, terwijl de bacterie-aantallen op en in de knol tijdens de bewaring zeer sterk afnemen. Het is mogelijk dat de gebruikte DNA-toets niet gevoelig genoeg is voor eventuele latente besmettingen in uitgangsmateriaal. De besmetting tijdens de teelt is opmerkelijk. Eerder is gevonden dat *Pcc* relatief slecht overleeft in de grond. Bij besmettingsproeven op het veld is toen ook geen overdracht naar *Zantedeschia* gevonden. Wel is het zo, dat bekend is dat er ziekteverwekkende *Pcc* en onschuldige stammen van deze bacterie voorkomen. Om deze twee groepen te onderscheiden wordt onderzoek verricht naar DNA-merkers die dit verschil tussen ziekteverwekkende en onschadelijke stammen moeten kunnen aantonen. Er zijn al aanwijzingen dat er van deze merkers bestaan. Er zijn zelfs aanwijzingen dat er bacteriestammen van *Pcc* bestaan die schadelijk zijn voor aardappel, maar niet voor *Zantedeschia*. Het is in principe mogelijk dat de volop aanwezige *Pcc* op de knollen bij de oogst een niet-pathogenen *Pcc* is.

9.5 Middelen en droging om *Erwinia*'s te beheersen

Middelen tegen bacteriën zijn nauwelijks beschikbaar. De middelen koperoxychloride, carvacrol en gramicidine (een antimicrobieel peptide) zijn in 2010 op laboratoriumniveau en/of in hyacint getest met als referentiemiddelen (het goed afdodende) formaline en Jet 5.

Dit is getest in een concentratiereeks om de concentratie te vinden die nog remmend werkt. In een zgn. 'minimale inhibitie concentratie' bepaling gaven koperoxychloride en carvacrol bij hogere concentraties (0.1%) een remmende werking tegen *Dickeya* en *Pectobacterium* isolaten; gramicidine had geen dodend effect, ook niet bij hogere concentraties. Dit bevestigt de bactericide werking van hoge concentraties koper, maar voor een eventuele toepassing van koperoxychloride moeten aanvullende experimenten uitgevoerd worden.

In 2011 zijn de etherische oliën carvacrol en Nopath getest in hyacint vanwege (volgens de praktijk) een potentieel remmende werking op *Erwinia* (agressief snot). De vraag hierbij was of het aantal "snotbollen" na een ruimtebehandeling met carvacrol of Nopath bij een uitwendige besmetting van de bol (bijvoorbeeld als gevolg van een sorteerhandeling) wordt verminderd. Hyacinten van de cultivar Pink Pearl werden kunstmatig besmet met *Dickeya solani*. Onder de gebruikte omstandigheden (containerproeven) bleken er geen duidelijke verschillen in aantallen snotbollen tussen behandeld en onbehandeld op te treden.

Carvacrol en Nopath bleken onder de hier aangelegde omstandigheden geen remmend effect op *Erwinia* infectie te hebben. De beschadiging en infectiedruk waren mogelijk te hoog; eventuele effecten kunnen hierdoor gemaskeerd zijn.

Aquanox is elektrochemisch geactiveerd water. In een onderzoek aan met *Dickeya solani* geïnfecteerde hyacinten bollen is bepaald of een behandeling van Aquanox een remmend effect heeft op rot in hyacintbollen. De aantallen "snotbollen" na behandeling van mechanisch met *Dickeya solani* geïnoculeerde hyacintenbollen met Aquanox is bepaald. Aquanox gaf nauwelijks tot geen werking onder de gebruikte experimentele omstandigheden. Een kanttekening is, dat de hyacintenbollen door condensvorming een waterfilm ontwikkelden die *Erwinia* infectiegevaar opleverde dan wel de juiste werking van Aquanox verminderde.

In 2009 is op een bedrijf tijdens het drogen van besmette partijen voor de droogwand de door de kisten gaande lucht over twee typen voedingsbodems geleid. In geen van de monsters werd *Erwinia* aangetoond. Twee jaar werden ook proeven met een luchtstroom uitgevoerd die over aangetaste bollen of agarplaten met *Erwinia*'s liep, waarbij de lucht gedurende verschillende tijden en op verschillende afstanden werd opgevangen op platen met groeimeedium. Er is geen overdracht van bacteriën vastgesteld wat doet concluderen dat via het drogen voor een droogwand via luchtverspreiding de kans op *Erwinia*-besmetting (zeer) klein of afwezig is. Wel bleek dat na 72 uur onder drogende condities er nog steeds levende bacteriën (*Pcc/Dickeya*) op de platen aanwezig waren. Dit betekent dat deze bacteriën bij normaal drogen in leven blijven.

9.6 Toekomstig onderzoek

De uitermate moeilijk te beheersen *Erwinia* bedreigt het voortbestaan van de pootaardappelteelt/bloembollenteelt in Nederland (het collectieve belang). Er bestaat nog een veelheid aan onderzoeksvragen, voortvloeiend uit de complexiteit van het probleem dat rond beheersing van *Erwinia* bestaat. Het onderzoek heeft *Erwinia* enigszins beheersbaar gemaakt voor de praktijk indien zij de vele teelt maatregelen goed in acht nemen. Onverwachte aantastingen treden echter nog elk jaar op en die leiden tot grote schade en onzekerheid.

De aardappelsector heeft tot nu toe op eigen initiatief een onderzoekstructuur ingericht en weet expertise op te bouwen in goede verstandhouding met - en samenwerking met kennisinstellingen en NAK. De bloembollensector dreigt achter te blijven; na 2013 is er geen budget opgenomen voor vervolgonderzoek behoudens enkele kleinschalige projecten.

De aanwijzingen die bestaan voor optredende variatie in bacterieziekte veroorzakende *Erwinia* en het noodzakelijke onderzoek om hierin klaarheid te brengen zijn gewasoverschrijdend. Ook in diverse glastuinbouwgewassen en zomerbloeiende gewassen bestaan forse *Erwinia*-problemen.

Bij de afsluitende bijeenkomst van het deltaplan C op 12 december 2012 is gememoreerd dat een vervolg *Erwinia*-onderzoek (Deltaplan 2.0?) zeer wenselijk is. Vragen die momenteel leven zijn:

1. Waar komt nu de initiële besmetting met *Erwinia* vandaan? Vanuit de aardappelsector wordt gedacht aan aerosolen of verspreiding via insecten. Het is de vraag of dit ook voor bloembolgewassen geldt.
2. De toenemende diversiteit binnen *Erwinia*-soorten. De *Dickeya*-groep lijkt nu redelijk in kaart gebracht, maar vooral in de *Pcc*-groep worden nieuwe taxonomische eenheden ontdekt.

Dit is van belang om o.a. verspreiding van deze virulente groepen te kunnen vaststellen.

3. Op toetsingsgebied heeft de bloembollensector behoefte aan “on site” detectie kits. Hier loopt momenteel een initiatief, dat gebaseerd is om serologische herkenning van *Dickeya* als groep. Verdere uitwerking is wenselijk in overleg met de belanghebbende productgroepen en KAVB/Anthos.

4. Binnen het laatste jaar van het Deltaplan B wordt onderzocht of de plant meer weerbaar gemaakt kan worden door toediening van antagonisten en elicitors. Vooral de laatste benadering kan de weerstand van bv. *Zantedeschia* verhogen en op die manier minder vatbaar maken voor *Erwinia*-infectie. Deze benadering vindt opgang ook in nadere gewassen zoals in de glastuinbouw, en wordt ook fundamenteel ondersteund door bv. het kunnen meten van parameters zoals salicylzuur om de effectiviteit van de behandeling met elicitors te kunnen meten. Verdere uitbreiding en focus op plantweerbaarheid zou zeer wenselijk zijn, ook in andere, *Erwinia*-gevoelige bolgewassen.

5. De werkbollentoets bij hyacint zou begeleid moeten worden door een aantal partijen te volgen gedurende de teelt van werkbol tot leverbaar. Vergelijking van testresultaten met de aantasting op de bedrijven zou meer duidelijkheid geven over de waarde van het toetsen en kunnen helpen bij het opstellen van eventuele normen voor de besmetting van werkbollen in de toekomst.

Binnen ‘Voorgezet diagnostisch onderzoek’ is een klein onderzoek uitgevoerd om vast te stellen of toetsing na vacuümbewaring van hyacintenbollen bruikbaar is. Na vacuümbewaring worden hyacintenbollen (net als aardappel) zacht en zijn goed toetsbaar. Onderzocht moet worden of daarmee meer latent besmette bollen kunnen worden opgespoord.

10 Output

10.1 Begeleidingscommissie vergaderingen

Deze hebben vier maal plaatsgevonden, meestal in maart van 2008, 2009, 2010, 2011 en 2012. Afsluiting Deltaplan *Erwinia* ism. aardappel Deltaplan *Erwinia*, Emmeloord vond plaats op 12 december 2012.

2008: Begeleidingscommissie Deltaplan *Erwinia* (7 april 2008)

2009: Begeleidingscommissie Deltaplan *Erwinia* (febr. 2009)

Begeleidingscommissie toetsen zuur, snot en bolrot (1/12/2009)

2010:

Begeleidingscommissie Deltaplan *Erwinia* (febr. 2010)

Begeleidingscommissie Snelle toetsen zuur, snot en bolrot (jan.2010)

Overleg Deltaplan C aardappelsector: HZPC (11 okt.2010)

2011:

Begeleidingscommissie Deltaplan *Erwinia* (11 febr.2011)

Begeleidingscommissie Snelle toetsen zuur, snot en bolrot (27-1-2011)

Bijeenkomst aardappel research Emmeloord 10-11 nov. 2010: *Erwinia* problems in hyacint bulbs

2012:

Begeleidingscommissie Snelle toetsen zuur, snot en bolrot (23-1-2012)

Deltaplan *Erwinia* (9 mei 2012)

Begeleidingscommissie en onderzoekscommissie Deltaplan *Erwinia* aardappelsector (12 december 2012)

10.2 Lezingen en Open dagen

2008

8 januari Anthos: Bolrot, *Erwinia* en zuur

16 januari studiegroep Bollenstreek Noord: Snot en bolrot

Kennisdag februari 2008: diverse onderwerpen, o.a. *Erwinia*

19 februari schuurbazen van exportbedrijven De Zuid: *Erwinia*

25 maart ledenvergadering KAVB hyacint Keukenhof: diverse onderwerpen o.a. *Erwinia*.

8 mei hyacint studiegroep De Zuid: *Erwinia*

30 mei Kennisdag PPO: diverse onderwerpen o.a. *Erwinia*

15 december T&P de Zuid: diverse onderwerpen o.a. *Erwinia*

2009

23 maart 2009 Ledenvergadering KAVB hyacint Keukenhof: diverse onderwerpen o.a. *Erwinia*.

16 april 2009 Studiegroep hyacint De Zuid: diverse actuele onderwerpen o.a. *Erwinia*

2010

22 maart 2010 ledenvergadering KAVB hyacint Keukenhof: diverse onderwerpen o.a. *Erwinia*

9-10 november 2010, Emmeloord; *Dickeya* in aardappel (voordracht over *Dickeya* in flower bulbs)

2011

3 maart 2011 Zantedeschia-middag Breezand. Lezing voor Zantedeschia-akwekers, diverse onderwerpen o.a.

Erwinia

24 maart 2011 studiegroep De Zuid Hyacint div actuele onderwerpen o.a. *Erwinia*
28 maart 2011 ledenvergadering KAVB hyacint Keukenhof: diverse onderwerpen o.a. *Erwinia*
2 maart 2011 ontbijtsessie HOBACH: *Erwinia* in hyacint: een “rot” probleem
20 mei 2011 opendag Innoventis: *Erwinia*
12 september 2011 Plantum NL lezing voor leden groep Zantedeschia, o.a. *Erwinia*

2012

22 maart Studieclub hyacint PPO Lisse inundatie, trips, Lissers en *Erwinia*
26 maart KAVB jaarvergadering productgroep Hyacint: Lissers, trips en *Erwinia*
27 april Ontbijtsessie HOBACH: *Erwinia*
15 mei Open dag PPO: *Erwinia* hyacint
Afsluiting Deltaplan C: Emmeloord 12 december 2012 ism. Deltaplan C van de aardappelsector
5 oktober Plantum NL lezing voor leden groep Zantedeschia, o.a. *Erwinia*

2013

24 januari Lisse, Studieclub hyacint De Zuid o.a. inundatie, Pythium en *Erwinia*
8 februari Kennisdag PPO: *Erwinia*
21 maart Lisse, KAVB productgroep Hyacint jaarvergadering op Keukenhof: lezing onderzoek hyacint over diverse onderwerpen en discussie over werkbollen keuring op agressief snot
8 mei Lisse jaarvergadering KAVB productgroep Zantedeschia, lezing o.a. over *Erwinia*

10.3 Vakbladartikelen

J. van Doorn, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen, Robert Dees en Wendy Martin 2009. *Erwinia*: rot voor de teler. Gewasbescherming 40(4): 200-204

J. van Doorn, R. Dees, W. Martin, P. Vreeburg en P. van Leeuwen Gezamenlijke toetsontwikkeling op *Erwinia chrysanthemi* in volle gang. BloembollenVisie 2009 164: p 20-21

H. Dodde. *Erwinia* op 60 procent hyacintenbedrijven. Nieuwe Oogst, za. 22 december 2012

J. van Doorn, W. Martin, R. Dees, P. van Leeuwen, P. Vreeburg. 2011. *Erwinia* problemen bolgewassen: op zoek naar de herkomst van besmetting. BloembollenVisie 212: p.18-19.

P. Vreeburg, P. van Leeuwen, W. Martin, R. Dees en J. van Doorn. 2011. Deltaplan *Erwinia*: informatie uit enquête onder hyacintentelers. BloembollenVisie 212: p.20-21.

P. Vreeburg en J. van Doorn. 2011. Agressief snot in hyacint. BloembollenVisie 220: p. 20-21.

P. van Leeuwen, W. Martin, R. Dees, J. Trompert en J. van Doorn. 2012. *Erwinia* in Zantedeschia: volgen van partijen en toetsen op tolerantie. BloembollenVisie 239: p. 22-23.

P. van Leeuwen, R. Dees, P. Vreeburg en J. van Doorn. 2012. Oorzaak *Erwinia* problemen Dahlia vooral *Dickeya dianthicola*. BloembollenVisie 246: p. 22-23.

A. Dwarswaard. 2013. Deltaplan *Erwinia* hielp piepers en bollen vooruit. BloembollenVisie 262: p.62-63.

P. Vreeburg en J. van Doorn 2013. Wees *Erwinia* de baas. BloembollenVisie (in preparatie)

Vanuit andere projecten:

J. van Doorn, P. Vreeburg et al. 2009. Bedrijfspraktijktoets op *Erwinia* in hyacint: geef de bol stress! BloembollenVisie 164: p.22-23.

J. van Doorn, P. Vreeburg, W. Martin, R. Miglino, G. van den Bovenkamp en E. de Haan 2010. Toetsing op *Erwinia* in hyacint mogelijk bij de NAK. BloembollenVisie 199 p26-27

J. van Doorn, P. Vreeburg et al. 2010. Thuisoets hyacintenbollen op *Erwinia*: sorteren en warm bewaren BloembollenVisie 192: p.24-25.

J. van Doorn, W. Martin, J Trompert, P. van Leeuwen, 2011 BloembollenVisie 234 p18-19 Voorspeellen van slijmstelen *Zantedeschia* moeilijk, voorkomen is beter.

J. van Doorn, P. Vreeburg et al. 2011. Thuisoets agressief snot bij hyacint: klaar voor algemeen gebruik BloembollenVisie 223: p.18-19.

P. Vreeburg en J. van Doorn. 2013. Toetsen van werkbollen op agressief snot: eerste stap naar gezondere teelt van hyacint. BloembollenVisie 266 (2013), p 22,23

Arie Dwarswaard, 2013. *Erwinia*toets werkbollen stap vooruit. Interview met Louis van Haaster (voorzitter productgroep Hyacint) en Peter Vreeburg over toetsen van werkbollen. BloembollenVisie 266 (2013), p 24

11 Literatuur

Bell K S, Sebaihia M, Pritchard L, Holden MT, Hyman LJ, et al. Proc Natl Acad Sci U S A :11105-10 (2004)
(Genomic sequence of *P. atrosepticum*)

Benson G. "Tandem Repeats Finder " Nucleic Acids Research (1999)

Burt, S. et al., 2007 Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. Int. J. of Food Microbiology 119: 346-350.

Czajkowski Robert, Waldo J. de Boer, Henk Velvis, and Jan M. van der Wolf 2010. Systemic Colonization of Aardappel Plants by a Soilborne, Green Fluorescent Protein-Tagged Strain of *Dickeya* sp. Biovar 3. Phytopathol. 100(2): 134-142.

Darrasse A et al. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to aardappel diseases. Appl. Environm. Microbiol. 60: 1437-1443

Doorn van J. et al. 2008. Rapport Beheersing van *Erwinia* in bolgewassen. PT-project nr. 12683

Doorn van J. et al. 2013. Rapport Snelle toetsen zuur, snot en bolrot. PT-project 13373

Doorn van J. et al. 2010. Rapport Pilot toetsing *Erwinia* in hyacint. PT project nr. 13771

Doorn van J. et al. 2009. Rapport Protocollering toetsen *Erwinia*. PT project 13061

Doorn van J. et al. 2009II. Rapport Slijmstelen bij *Zantedeschia*. PT project nr.12804-2

Doorn van J. et al. 2011. Rapport Vervolgonderzoek slijmstelen bij *Zantedeschia*. PT project nr. 13751

Duyvensteijn, R. et al. 2011. Toepassing van Aquanox in de bollensector. Rapport PT nr.14000-05.

Kim, J. M., et al., 1995. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOME ESSENTIAL OIL COMPONENTS AGAINST 5 FOODBORNE PATHOGENS. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43, 2839-2845.

Luzzatto, T. et al (2007) Efficient, long-lasting resistance against the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* in Cana lilly provided by the plant activator methyl jasmonate. Plant Pathology (56) pp692-701

Moran Y. et al (2008), Differential pathogenicity and genetic diversity among *Pectobacterium carotovora* ssp *carotovorum* isolates from monocot and dicot hosts support early genomic divergence within taxon. Environmental Microbiology (10) pp. 2746-2759

Nassar A., et al. (1996). Characterisation of *Erwinia Chrysanthemi* by pectinolytic Isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR Amplified fragments of *pel* genes. Applied and Environmental Microbiology, 62. 2228-2235

Neri, F. et al., 2006. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. Plant Pathology 55: 100-105.

Prins H en A.. Breukers 2008. In de puree? De gevolgen van de aantasting door *Erwinia* voor de poot aardappelsector in kaart gebracht. Rapport LEI, Den Haag.

Schouls L. et al (2004). Multiple- Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis of Dutch *Bordetella pertussis* Strains Reveals Rapid Genetic Changes with Clonal Expansion during Late 1990s. *Journal of Bacteriology*, 186, no 16

Snijder, R.C. et al (2002) Evaluation of tests to determine resistance of *Zantedeschia* spp. (Araceae) to soft rot caused by *Erwinia carotovera* subsp. *carotovera*. *European Journal of Plant Pathology*. 108: pp565-571

Tsrur L et al. (2009) Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in aardappel crops in Israel. *European Journal of Plant Pathology*. 123, 311-320

Suga, H., L. R. Gale, H.C. Kistler (2004) Development of VNTR markers for two *Fusarium graminearum* clade species. *Molecular Ecology Notes*, 4 468-470

Leeuwen van P. et al. 2009. Slijmstelen. PPO PT report 1280-2009

Vreeburg P. et al. 2013 Aanzet voorkeuring op *Dickeya* in werkbollen van Delft Blue. PPO PT rapport 14741